

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A HDL,
APOA1 Y PON1, EN EL ANEURISMA DE AORTA
ABDOMINAL EXPERIMENTAL Y HUMANO**

Memoria presentada por

MÓNICA M^a TORRES FONSECA

Licenciada en Medicina

para optar al

Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2016



D. JOSÉ LUIS MARTÍN VENTURA, Doctor en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, y Dña ELENA BURILLO IPIENS, Doctora en Bioquímica por la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN

Que Dña MÓNICA M^a TORRES FONSECA, Licenciada en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado en el Laboratorio de Nefrología Experimental y Patología Vascular de la Fundación Jiménez Díaz, bajo su dirección, la presente Tesis Doctoral con título: **PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A HDL, APOA1 Y PON1, EN EL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL EXPERIMENTAL Y HUMANO.**

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid, a 7 de junio de 2016.

D. José Luis Martín Ventura

Dña. Elena Burillo Ipiens

Tutor: D. Luis Felipe Riera del Moral

A mi madre

A mi abuela Teotiste

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. José Luis Martín Ventura, director de esta Tesis Doctoral, del que he recibido en todo momento la ayuda que he necesitado, los mejores consejos y apoyo en los momentos difíciles.

Agradecer a la Dra. Elena Burillo Ipiens, codirectora de esta tesis, su disponibilidad, sus acertadas explicaciones, el cuidado y detalle que siempre ha puesto en el trabajo, y el haber compartido juntas las alegrías e inquietudes que hemos ido viviendo en este tiempo.

Asimismo nuestro mi agradecimiento:

A todas las instituciones que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, comenzando por el Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz, y siguiendo por la propia Fundación Jiménez Díaz, la Universidad Autónoma de Madrid y el CNIC, que me han permitido disponer de sus instalaciones y medios materiales.

Al Dr. Jesús Egido de los Ríos y a los miembros del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular de la Fundación Jiménez Díaz. A mis compañeros del Laboratorio de Investigación, en especial al Dr. Carlos Tarín por introducirme en la cirugía experimental, así como a todas aquellas personas que han contribuido a la realización de este trabajo.

A los cirujanos vasculares del Hospital de Galdakao-Usansolo, por haberme proporcionado los datos clínicos necesarios y por prestarme su imprescindible colaboración.

Al Dr. Jes Lindholt, por permitirme disponer de los datos recogidos en Dinamarca, de gran importancia para llevar a cabo esta tesis.

Al Dr. Michael Aviram, por cederme una parte importante de los animales que han sido necesarios para el trabajo de cirugía experimental.

A mis compañeros del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Universitario de Getafe, por la ayuda que he recibido de ellos en todo este año.

A Pablo, que ha sido para mí un apoyo constante e incondicional en todo momento.

A mis abuelos que, aunque ya no están conmigo, sé que caminan siempre a mi lado.

A mi madre.

INDICE

	ABREVIATURAS	5
	RELACIÓN DE FIGURAS	9
	RELACIÓN DE TABLAS	11
	RESUMEN	13
1	INTRODUCCIÓN	15
1.1	EL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL INFRARRENAL	17
1.2	FISIOPATOLOGÍA: INFLAMACIÓN, ESTRÉS OXIDATIVO, PROTEOLISIS	21
1.2.1	ILT y proteolisis	23
1.2.2	ILT y estrés oxidativo	25
1.2.3	Media patológica	27
1.2.4	Adventicia e inflamación	27
1.3	HDL, ApoA1 y PON1	29
1.3.1	HDL	29
1.3.2	ApoA1	33
1.3.3	PON1	34
1.4	MODELOS EXPERIMENTALES DE AAA	34
1.4.1	AAA inducido por elastasa	35
1.4.2	AAA inducido por angiotensina II	35
1.5	BIOMARCADORES DEL AAA	37
1.6	PROTEÓMICA	39
1.6.1	Técnicas proteómicas basadas en gel	40
1.6.2	Espectrometría de masas (MS)	40
1.6.3	Técnicas proteómicas a gran escala, no basadas en gel, acopladas con MS	41
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
3	MATERIALES Y MÉTODOS	47

3.1	PARTICIPANTES.....	49
3.1.1	Cohortes de los hospitales de Galdakao-Usansolo e IIS-FJD.....	49
3.1.2	Estudio Viborg.....	51
3.1.3	Registro Vascular Danés.....	51
3.2	ESTUDIOS PROTEÓMICOS.....	52
3.2.1	Muestras.....	52
3.2.2	Depleción del plasma.....	52
3.2.3	Análisis mediante marcaje iTRAQ e identificación por LC-MS/MS.....	53
3.2.4	Análisis sin marcaje e identificación por LC-MS/MS.....	55
3.3	DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.....	56
3.4	MODELOS EXPERIMENTALES.....	56
3.4.1	Modelo de infusión con angiotensina II.....	56
3.4.2	Modelo de perfusión con elastasa.....	57
3.5	ESTUDIOS HISTOLÓGICOS E INMUNO-HISTOQUÍMICOS.....	59
3.5.1	Muestras humanas.....	59
3.5.2	Muestras experimentales.....	59
3.6	ESTADÍSTICA.....	60
4	RESULTADOS.....	63
4.1	ESTUDIO ApoA1.....	65
4.1.1	Análisis por iTRAQ de plasma de pacientes con AAA.....	65
4.1.2	Validación de ApoA1 en pacientes con AAA.....	69
4.1.3	ApoA1 en tejido de AAA.....	73
4.1.4	ApoA1/HDLc se asocia negativamente con el crecimiento de AAA y la necesidad de intervención quirúrgica posterior.....	74
4.1.5	El HDLc se asocia de forma negativa con la incidencia de AAA, independientemente de la enfermedad aterosclerótica.....	77
4.1.6	Efecto del péptido mimético de ApoA1, D4F, en el desarrollo del AAA experimental.....	79
4.2	ESTUDIO PON1.....	80

4.2.1	Análisis proteómico del plasma y validación de los resultados.....	80
4.2.2	Disminución de la actividad de PON1 en suero, tanto en el AAA experimental como humano.....	87
4.2.3	PON1 en tejido de AAA	89
4.2.4	PON1 no se asocia con el crecimiento del AAA y la necesidad de intervención quirúrgica posterior.....	90
4.2.5	La sobreexpresión de PON1 previene el daño inducido por elastasa en un modelo experimental de AAA	91
4.2.6	La sobreexpresión de PON1 reduce la pérdida de CMLV y disminuye la apoptosis en el AAA experimental	94
4.2.7	La sobreexpresión de PON1 disminuye el estrés oxidativo y el contenido inflamatorio en el AAA	96
5	DISCUSIÓN	99
5.1	ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL: SITUACIÓN ACTUAL	101
5.2	BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS Y PRONÓSTICOS DE AAA.....	103
5.2.1	La proteómica como herramienta en la búsqueda de biomarcadores	103
5.2.2	La HDL y sus proteínas constitutivas y asociadas: ApoA1 y PON1	105
5.2.3	ApoA1 y PON1 como biomarcadores diagnósticos	107
5.2.4	ApoA1 y PON1 como biomarcadores pronósticos	109
5.2.5	Estudio epidemiológico.....	110
5.3	MECANISMOS BIOLÓGICOS POTENCIALMENTE IMPLICADOS...	110
5.3.1	Retención en el ILT y la HDL disfuncional.....	111
5.3.2	Otros posibles mecanismos.....	113
5.4	ABORDAJES TERAPÉUTICOS.....	115
5.4.1	Mejora de la evolución del AAA experimental mediante el péptido mimético de ApoA1, D4F	116
5.4.2	Mejora de la evolución del AAA experimental mediante la sobreexpresión de PON1	118
5.5	APLICACIONES CLÍNICAS.....	121

5.5.1	Potencial aplicación clínica de los biomarcadores analizados. Posibles limitaciones de los resultados obtenidos.....	121
5.5.2	Tratamiento médico que incremente el HDLc o su funcionalidad	123
6	CONCLUSIONES	127
7	BIBLIOGRAFÍA	131

ABREVIATURAS

En algunos casos se ha mantenido la abreviatura en inglés por su frecuente utilización en el lenguaje científico.

AAA	Aneurisma de aorta abdominal
AngII	Angiotensina II
Anti-ApoA1	Anticuerpo anti-apolipoproteína A1
ApoA1	Apolipoproteína A1
ApoA2	Apolipoproteína A2
ApoA4	Apolipoproteína A4
ApoE -/-	Deleción en el gen de la apolipoproteína E
AUC	<i>Area under the curve</i>
CETP	Proteína que transfiere ésteres de colesterol
CMLV	Células del músculo liso vascular
DE	Desviación estándar
DIGE	Electroforesis en gel con marcaje diferencial
DM	Diabetes Mellitus
EE	Error estándar
EF 2D	Electroforesis bidimensional
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
Fe ²⁺	Ion ferroso
Fe ³⁺	Ion férrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Hb	Hemoglobina
HDL	Lipoproteína de alta densidad

HDLc	Colesterol asociado a la lipoproteína de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HR	<i>Hazard Ratio</i>
HTA	Hipertensión arterial
IAM	Infarto agudo de miocardio
IL	Interleucina
ILT	Trombo intraluminal
iNOS	Isoforma inducible de óxido nítrico sintasa
iTRAQ	<i>Isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
LC	Cromatografía líquida
LCAT	Lecitín colesterol aril transferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLc	Colesterol asociado a la lipoproteína de baja densidad
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MARS14	<i>Multiple Affinity Removal System Column 14</i>
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MDA	Malondialdehído
MMP	Metaloproteinasa
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa
MPO	Mieloperoxidasa
MS	Espectrometría de masas
NADPH oxidasa	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido oxidasa
NGAL	Lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos
NO	Óxido nítrico
O ²⁻	Anión superóxido
PAP	Complejos plasmina-antiplasmina

PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PCR	Proteína C Reactiva
PMN	Células polimorfonucleares
PON1	Paraoxonasa 1
PPARs	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP	Fase reversa
RR	Riesgo relativo
SOD	Superóxido dismutasa
TAC	Tomografía axial computarizada
TG	Triglicéridos
TGF β	Factor de crecimiento transformante β
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
TOF	<i>Time Of Flight</i>
US	Ultrasonografía
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1: Aneurisma de aorta abdominal a nivel infrarrenal.....	17
Figura 2: Modelo estructural del aneurisma de aorta abdominal.....	22
Figura 3: Diferentes capas del ILT humano.	23
Figura 4: Composición de la partícula HDL.	30
Figura 5: Funciones antiaterogénicas de la HDL.	32
Figura 6: Proceso metodológico del estudio.....	42
Figura 7: Porcentaje de proteínas deplecionadas en los tres métodos empleados.....	53
Figura 8: Modelo de AAA experimental por infusión de elastasa.	58
Figura 9: Proteínas que aumentan o disminuyen en pacientes con AAA en seguimiento, con respecto a controles (estudio proteómico con marcaje iTRAQ).	66
Figura 10: Proteínas que aumentan o disminuyen en pacientes con AAA en rango quirúrgico, con respecto a controles (estudio proteómico con marcaje iTRAQ).	67
Figura 11: Proteínas que aumentan o disminuyen en pacientes con AAA en rango quirúrgico, con respecto a pacientes con AAA en seguimiento (estudio proteómico con marcaje iTRAQ).....	68
Figura 12: Concentraciones de ApoA1 en controles, pacientes con AAA en seguimiento y pacientes con AAA en rango quirúrgico..	70
Figura 13: Correlación negativa de la concentración de ApoA1 con el diámetro aórtico y con el volumen del trombo.	71
Figura 14: Correlación positiva de la concentración de ApoA1 con la concentración de HDLc.....	72
Figura 15: Curva ROC de ApoA1.	73
Figura 16: ApoA1 en tejido aneurismático.....	73
Figura 17: MDA en tejido aneurismático.	74
Figura 18: Asociación del HDLc con la tasa de crecimiento aneurismático.....	76
Figura 19: Asociación del HDLc con la necesidad de reparación quirúrgica.	77

Figura 20: Imágenes de ultrasonografía de ratones ApoE ^{-/-} infundidos con angiotensina II y tratados con péptido mimético D4F o salino.	79
Figura 21: Efecto del péptido mimético D4F versus salino, en el desarrollo del AAA experimental.....	80
Figura 22: Niveles sistémicos de PON1.....	85
Figura 23: Curva ROC de la concentración de PON1.....	86
Figura 24: Actividad sistémica de PON1	87
Figura 25: Curva ROC de la actividad de PON1.....	88
Figura 26: Medida de la actividad de PON1 en ratones control y ratones con AAA experimental mediante infusión de elastasa.....	89
Figura 27: Imágenes de la tinción de PON1 en tejido de AAA humano.....	90
Figura 28: Actividad arilesterasa de PON1 en función del crecimiento del AAA (Estudio Viborg)	91
Figura 29: Tinción de Tricrómico de Masson y análisis cuantitativo del diámetro aórtico en ratones PON1 transgénicos y salvajes	92
Figura 30: Tinción de Verhoeff Van Gieson y análisis cuantitativo de pérdida de capas de elastina en ratones PON1 transgénicos y salvajes.....	93
Figura 31: Tinción de las fibras de α -actina y análisis cuantitativo de pérdida de CMLV en ratones PON1 transgénicos y salvajes.....	94
Figura 32: Tinción de <i>cleaved</i> -PARP y análisis cuantitativo de apoptosis en ratones PON1 transgénicos y salvajes.....	95
Figura 33: Tinción de 8-OHdG y análisis cuantitativo de estrés oxidativo en en ratones PON1 transgénicos y salvajes.....	96
Figura 34: Tinción de CD68 y análisis cuantitativo de macrófagos en en ratones PON1 transgénicos y salvajes.....	97
Figura 35: Tinción de MCP-1 y análisis cuantitativo de MCP-1 en ratones PON1 transgénicos y salvajes.....	98

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1: Características clínicas y demográficas de los grupos estudiados en la cohorte del H. Galdakao (Bizkaia, España).	65
Tabla 2: Concentraciones en suero de los parámetros bioquímicos y lipídicos en el grupo control y en los pacientes con AAA en seguimiento y en rango quirúrgico.	70
Tabla 3: Análisis multivariante de ApoA1 con el diámetro aórtico.	71
Tabla 4: Análisis multivariante de ApoA1 con el volumen del trombo del AAA.....	72
Tabla 5: Análisis univariante de ApoA1/HDLc con el crecimiento, así como la asociación de otros posibles factores de confusión tanto con el crecimiento como con la HDL.	75
Tabla 6: Análisis de regresión lineal múltiple de la HDL como predictora de la tasa de crecimiento aneurismático en pacientes con AAA en seguimiento (Estudio Viborg)....	76
Tabla 7: Características clínicas y demográficas del Registro Vascular Danés.	78
Tabla 8: Análisis de regresión lineal múltiple del AAA como predictor independiente de los niveles de HDLc ajustando por los factores de confusión identificados.....	78
Tabla 9: Diferencias en cuanto a los niveles de proteínas en plasma, identificados mediante proteómica sin marcaje LC-MS/MS, entre pacientes con AAA en seguimiento vs controles.	82
Tabla 10: Diferencias en cuanto a los niveles de proteínas en plasma, identificados mediante proteómica sin marcaje LC-MS/MS, entre pacientes con AAA en rango quirúrgico vs controles.....	83
Tabla 11: Diferencias en cuanto a los niveles de proteínas en plasma, identificados mediante proteómica sin marcaje LC-MS/MS, entre pacientes con AAA en rango quirúrgico vs pacientes con AAA en seguimiento.....	84
Tabla 12: Características clínicas y demográficas de los grupos estudiados en la cohorte del H. Galdakao (Bizkaia, España).	85
Tabla 13: Análisis univariante y multivariante de la concentración de PON1 con la presencia de AAA.	86

Tabla 14: Características clínicas y demográficas de los grupos estudiados en la cohorte del IIS-FJD (Madrid, España)..... 87

Tabla 15: Análisis univariante y multivariante de la actividad de PON1 con la presencia de AAA. 88

RESUMEN

Esta Tesis Doctoral tiene como objetivo la identificación de nuevos biomarcadores de aneurisma de aorta abdominal (AAA). Para la identificación de potenciales biomarcadores, en el presente trabajo se han utilizado diferentes técnicas de proteómica de última generación, empleándose espectrometría de masas (MS) y cuantificación de proteínas con y sin marcaje, mediante iTRAQ (*Isobaric tags for relative and absolute quantitation*) y *label-free*, respectivamente. Como resultado de estos estudios, se identificaron la apolipoproteína A1 (ApoA1) y la paraoxonasa 1 (PON1), dos proteínas presentes en las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Posteriormente, se ha estudiado el valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico de estas proteínas tanto a nivel clínico como experimental.

Numerosos estudios han demostrado la relación inversa entre la concentración de colesterol asociado a la lipoproteína de alta densidad (HDLc) y el riesgo cardiovascular. La partícula HDL no sólo es importante por su papel en el transporte y metabolismo lipídico, sino que presenta una serie de funciones antioxidantes, antiinflamatorias y antitrombóticas, relacionadas con su estructura y composición proteica. Además, el HDLc es un factor de riesgo independiente de la presencia del AAA que se asocia inversamente con el diámetro aórtico. En un estudio de cohorte prospectivo de base poblacional del AAA en seguimiento, hemos podido demostrar la asociación negativa de ApoA1/HDLc con el crecimiento aneurismático y con la necesidad de reparación quirúrgica posterior, afianzando la hipótesis de ApoA1, no sólo como biomarcador diagnóstico independiente, sino también pronóstico de la enfermedad. Además, en un estudio epidemiológico de casos y controles entre pacientes con AAA y pacientes ateroscleróticos, se ha demostrado que la concentración de HDLc es menor en el AAA, siendo esta reducción independiente de la presencia de aterosclerosis en los pacientes con AAA. En el caso de PON1, hemos observado que tanto su concentración como su actividad se asocia a la presencia pero no a la evolución del AAA.

Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha observado la expresión y localización de ApoA1 y PON1 en tejido aneurismático, tanto en el trombo intraluminal (ILT) como en la pared aórtica, siendo más débil en esta última. En tejido aórtico sano no se evidenció la presencia de ninguna de las proteínas. Estos resultados sugieren la retención de estas proteínas circulantes en el trombo, que podría estar asociado a la pérdida de su capacidad funcional por procesos oxidativos.

Finalmente, se han planteado dos modelos experimentales de AAA para estudiar el papel de estas proteínas en la fisiopatología del AAA. En el caso de ApoA1, se realizó el modelo experimental murino de infusión de angiotensina II (AngII), observando que la administración del péptido mimético de ApoA1, D4F, retardó la progresión de la enfermedad. Así, mediante seguimiento con ultrasonografía, los ratones tratados con D4F presentaron un diámetro aórtico menor que los del grupo control. En el caso de PON1, se planteó un modelo experimental de AAA mediante la infusión de elastasa en ratones de fenotipo salvaje y ratones que sobreexpresaban la proteína PON1 humana. Hemos demostrado que la sobreexpresión de PON1 disminuye la dilatación aórtica, la degradación de las capas elásticas y el número de las células de músculo liso vascular (CMLV). Los mecanismos que subyacen son la disminución del estrés oxidativo, la apoptosis, el infiltrado de macrófagos y la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1).

En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren el potencial uso de ApoA1 y PON1 como biomarcadores diagnósticos, así como el de ApoA1 como biomarcador pronóstico de AAA. Asimismo, nuestros estudios a nivel experimental indican que, en el tratamiento de pacientes con AAA, podrían ser útiles terapias dirigidas a mejorar la funcionalidad de HDL ya sea mediante péptidos miméticos de ApoA1 o mediante la sobreexpresión de PON1.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 EL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL INFRARRENAL

El aneurisma de aorta abdominal (AAA) es una patología que consiste en una dilatación localizada y permanente de la aorta, generalmente en su porción infrarrenal (*Figura 1*). Se define un aneurisma como una dilatación mayor al 50% del diámetro del vaso en zonas adyacentes por lo que, en la aorta abdominal, se considera patológico un diámetro mayor o igual a 3 cm. Se puede considerar una enfermedad sistémica, existiendo en la mayor parte de los casos una afectación de todo el árbol vascular del paciente. Se ha demostrado una importante asociación entre pacientes con AAA y con enfermedad coronaria o enfermedad arterial periférica. Su evolución natural es la dilatación progresiva, hasta su potencial rotura. Esta dilatación no ocurre de forma lineal, sino que presenta unos momentos de aceleración y otros de estabilidad, lo que dificulta el seguimiento y, con ello, empeora el pronóstico de la enfermedad. Cuando la rotura aneurismática ocurre, va asociada a un 75% de mortalidad ^{1;2}.

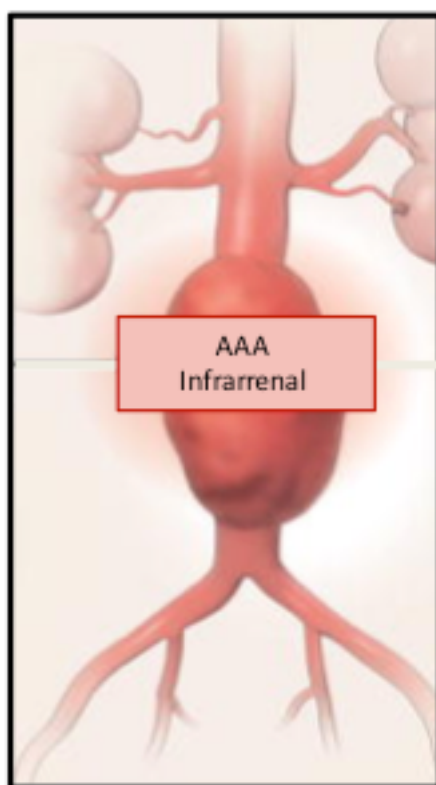


Figura 1: Aneurisma de aorta abdominal a nivel infrarrenal. Adaptado de Weintraub NL.
“Understanding abdominal aortic aneurysm”. *N Engl J Med*. 2009.

Respecto a su epidemiología, tiene una afectación 6 veces superior en los hombres frente a las mujeres, incidiendo en más de un 5-8% de la población masculina mayor de 65 años, y en un 2% de la población femenina en el mismo rango de edad ¹. La incidencia media anual de nuevos diagnósticos de AAA en poblaciones occidentales oscila entre 0,4-0,67% ³. En los últimos años, la incidencia de rotura aneurismática está en crecimiento, llegando al 1-2% del total de muertes ⁴. Una posible explicación a este hecho es el aumento en la esperanza de vida poblacional, lo que favorecería que los pacientes con AAA, principalmente aquellos no diagnosticados, presenten un crecimiento aneurismático progresivo hasta llegar a su rotura. En cualquier caso, la magnitud de la mortalidad relacionada con la rotura aneurismática de la aorta abdominal está infraestimada, especialmente si se tiene en cuenta el bajo número de casos en que se realiza un examen *postmortem* ¹.

El AAA cursa habitualmente de forma silente, de manera que el diagnóstico suele ocurrir como un hallazgo casual tras una prueba de imagen [ultrasonografía (US), tomografía axial computarizada (TAC) o resonancia magnética nuclear (RMN)] realizada por patología concomitante del paciente. Sin embargo, en algunos países se realizan programas de *screening* utilizando la US en ciertos grupos de riesgo, lo que ha demostrado ser útil desde el punto de vista coste-efectivo ⁵. Actualmente el manejo del AAA, cuando su diámetro se mantiene entre 3-5 cm, es conservador. Se basa en un seguimiento periódico con pruebas de imagen, un adecuado control de los factores de riesgo cardiovascular y un tratamiento médico con antiagregación y estatinas, si bien actualmente no existe ningún tratamiento farmacológico efectivo capaz de limitar su progresión o evitar su rotura. Este tipo de manejo será el adecuado siempre que el AAA no alcance los 5,5 cm de diámetro. A partir de ese momento, dado que el riesgo de rotura supera el riesgo de la intervención quirúrgica, se opta por esta última. En función de las características del paciente y de la morfología y la localización del AAA, la intervención quirúrgica podrá ser de tipo endovascular o consistirá en cirugía abierta ⁶. La indicación para determinar si un paciente es candidato a un manejo quirúrgico o conservador será, por tanto, el diámetro aórtico, la tasa de crecimiento y el potencial riesgo quirúrgico del paciente.

Respecto a la fisiopatología del AAA, no se dispone de un conocimiento completo de la misma debido a su complejidad y los diversos factores que ésta implica ⁷. Sin embargo, su investigación es fundamental a la hora de determinar posibles biomarcadores que

permitan un diagnóstico precoz e identificar tratamientos farmacológicos eficaces y efectivos, no quirúrgicos, capaces de prevenir su progresión.

Factores de riesgo

La patogénesis del AAA es compleja y multifactorial. Aunque con diferentes causas, comparte varios factores de riesgo asociados con la enfermedad aterosclerótica como son: edad, tabaquismo, sexo masculino, susceptibilidad genética, hipertensión arterial (HTA), obesidad centrípeta, niveles reducidos de colesterol asociado a la lipoproteína de alta densidad (HDLc), enfermedad coronaria y claudicación intermitente ⁸. Cabe destacar el hecho de que la Diabetes Mellitus (DM), factor de riesgo para la aterosclerosis es, por el contrario, un factor protector para el AAA ⁶.

Conocer todos estos factores es fundamental, puesto que permite determinar aquellos individuos con alto riesgo de desarrollar AAA y, con ello, poder hacer un cribado dirigido a este grupo de pacientes.

a) Edad

La incidencia del AAA aumenta con el paso de los años. Las muertes por rotura aneurismática rara vez ocurren en pacientes por debajo de los 65 años y, a partir de este momento, el riesgo se incrementa un 40% cada 5 años ⁹.

b) Sexo

Como se ha comentado previamente, el riesgo en varones es muy superior al de las mujeres, debido a factores hormonales, genéticos y la diferente exposición a factores de riesgo ¹⁰. Por este motivo, el *screening* en mujeres no se considera coste-efectivo. Pero la enfermedad en las mujeres cursa de forma más severa: presenta un crecimiento más rápido, mayor riesgo de rotura con menores diámetros y mayor mortalidad hospitalaria asociada a la rotura y la intervención ¹¹.

c) Historia familiar

Existe un aumento en la prevalencia de AAA entre familiares de primer grado con AAA, llegando al 15-19% ¹². La historia familiar positiva en primer grado de AAA aumenta el riesgo de que una persona lo padezca hasta diez veces, y se presenta a edades más tempranas ¹³.

d) Consumo de tabaco

El tabaco incrementa el riesgo relativo (RR) del AAA 7,6 veces ¹⁴. Aquellos varones fumadores de más de 25 cigarrillos/día presentan un riesgo de AAA 15 veces superior respecto a aquellos hombres que nunca han fumado ¹⁵. El número de cigarrillos al día es importante, pero lo es más la duración del hábito tabáquico. Cada año de tabaquismo incrementa el RR de AAA un 4% ¹⁴. Una vez cesado el consumo de tabaco, el riesgo de AAA se mantiene hasta 10 años. Las causas a través de las cuales el tabaco está implicado en la formación del AAA son aún desconocidas. Se valoran mecanismos como la inhibición en la síntesis de colágeno, una alteración en la expresión de metaloproteinasas (MMP) y una posible relación con el estrés oxidativo ¹⁶.

e) Hipertensión arterial

La HTA se asocia con un incremento del riesgo de formación del AAA y su rotura. Sin embargo, el tratamiento antihipertensivo no ha demostrado eficacia en cuanto a ser capaz de frenar la progresión del AAA ¹⁷.

f) Cardiopatía y enfermedad arterial periférica

La incidencia de enfermedad coronaria y de enfermedad arterial periférica, ambas reflejo de la presencia de enfermedad aterosclerótica, es muy alta en pacientes con AAA.

Los eventos cardiovasculares son la principal causa de muerte en pacientes con AAA ¹⁸. El riesgo de presentar un evento cardiovascular en pacientes con AAA es un 52% superior frente al de aquellos pacientes sin patología aórtica aneurismática ¹⁹.

g) Niveles de lípidos

La asociación entre los niveles de lípidos en plasma y AAA no es sencilla. Hay resultados contradictorios respecto a que los niveles de colesterol sérico por encima de 240mg/dl se asocien con un riesgo incrementado de AAA ^{20; 21}. También se ha estudiado el posible papel que las estatinas pudieran tener en cuanto a la estabilización del AAA, si bien hacen falta estudios con un mayor número de pacientes y de carácter prospectivo para poder aseverarlo ²². En los últimos años se han publicado estudios en los que se describe de forma clara una relación entre la concentración baja de HDLc y la presencia del AAA, convirtiéndose el HDLc a bajas concentraciones en un factor de

riesgo para el desarrollo de la enfermedad ²³. Por otra parte, otras líneas de investigación apuntan a que las alteraciones lipídicas en el AAA podrían estar relacionadas con la presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL) anormales, pequeñas y con un fenotipo que podemos denominar aterogénico ²⁴. Esto llevaría a pensar que las medidas tradicionales de colesterol y triglicéridos (TG) no serían suficientes para evaluar la contribución de la dislipemia a la enfermedad.

h) Diabetes Mellitus (DM)

En contraste con su papel como factor de riesgo de la enfermedad aterosclerótica, la DM se ha descrito como factor protector en el desarrollo del AAA. La DM se asocia a una baja prevalencia del AAA y, si éste existe, a un crecimiento más lento del mismo ¹⁷. Una teoría para explicar este hecho se basa en la posibilidad de que la glicosilación genere un aumento de la resistencia a la proteólisis del colágeno ¹¹.

1.2 FISIOPATOLOGÍA: INFLAMACIÓN, ESTRÉS OXIDATIVO, PROTEOLISIS

La estructura del AAA en su organización espacial, de dentro hacia fuera, tal como se refleja en la *Figura 2*, consta de:

- a) Trombo intraluminal (ILT) con distintas capas (luminal y abluminal) y rico en Hemoglobina (Hb). Es importante señalar aquí cómo, debido a la presencia del ILT, en el AAA no hay endotelio o íntima ²⁵.
- b) Fina media degradada en la que los componentes elásticos han desaparecido prácticamente.
- c) Adventicia de características inflamatorias y/o fibróticas.

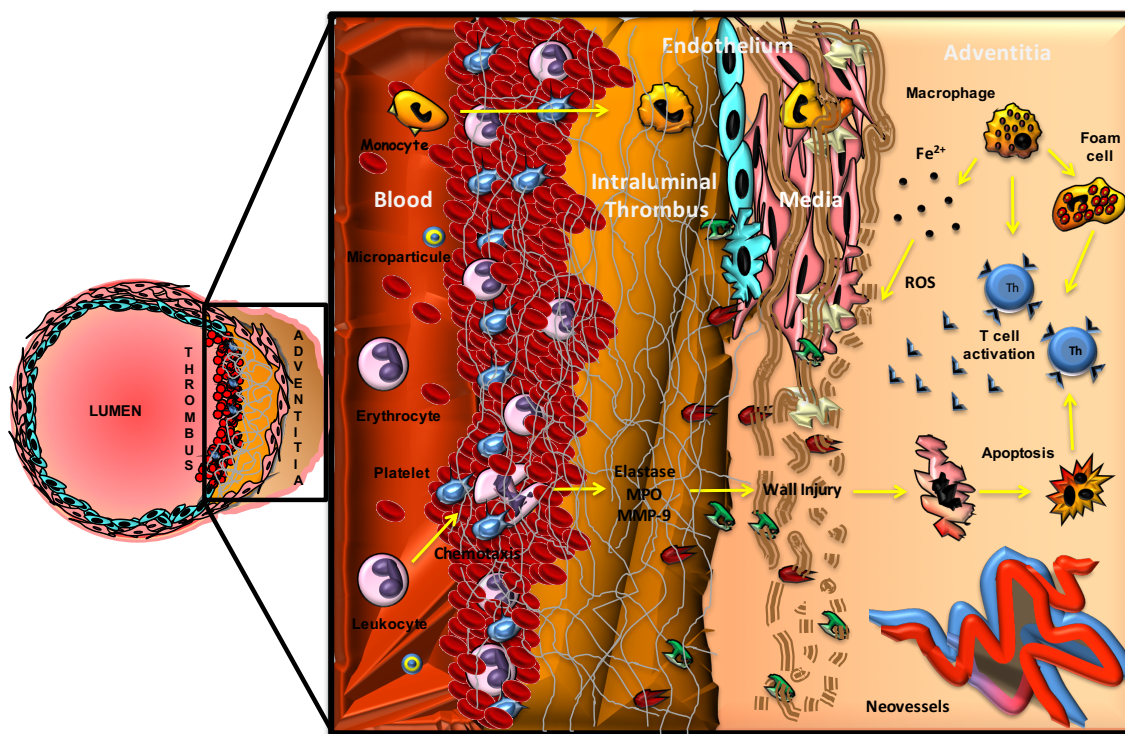


Figura 2: Modelo estructural del aneurisma de aorta abdominal. Tomado de *Vascular Proteomics*, Martin-Ventura JL et al. Ed. Springer International Publishing Switzerland. 2016. Fe²⁺: Ion ferroso. ROS: Especies reactivas de oxígeno. MPO: Mieloperoxidasa. MMP-9: Metaloproteínasa-9.

El transporte en la pared arterial aórtica, de forma fisiológica, ocurre de manera ortogonal, desde la luz hasta la adventicia. Esta convección centrífuga es dependiente de la presión de la sangre, de las propiedades de filtración de la pared arterial y de la velocidad de cizallamiento²⁶. Es probable que esta convección se acreciente en el AAA debido a la gran porosidad del ILT, la ausencia de endotelio, la degradación de las fibras elásticas de la media, el escaso cizallamiento debido a la recirculación en los vórtices y la alta amplitud de pulsatilidad debida a la recirculación²⁷. Los mediadores, generados en la interfaz sangre-ILT son, por lo tanto, transportados de forma centrífuga hacia la media y la adventicia en el AAA²⁵.

La fisiopatología del AAA es compleja, e implica múltiples factores como la inflamación, la proteólisis o el estrés oxidativo. Estos son procesos clave subyacentes a la patogénesis y expansión de los AAA²⁵.

La complicación más temida del AAA es la rotura, lo que se relaciona de forma directa con su diámetro. Este crecimiento que, como se ha mencionado, no ocurre de forma

lineal, no es tampoco un crecimiento pasivo, sino que está en relación con los mencionados procesos de inflamación y degeneración tisular²⁸.

Se puede decir que el AAA es una forma particular de aterotrombosis, en la que la proteólisis juega un papel determinante en su patogénesis²⁹. Sin embargo, mientras que en la aterotrombosis el evento característico es la formación de un *core* necrótico en la íntima arterial, el AAA está caracterizado por la formación del ILT, la dilatación y la desestructuración de la capa media y la presencia de una reacción adventicial.

1.2.1 ILT y proteolisis

El ILT es un neot tejido biológicamente activo, de estructura laminada, con varias capas de redes de fibrina (*Figura 3*). En su cara luminal, de formación más reciente, se compone de un reticulado de fibrina no degradado. Más externamente encontramos una capa abluminal, activamente fibrinolizada. Esta observación apoya la hipótesis de que existe un equilibrio biológico dinámico entre la formación de coágulos en la cara luminal en contacto con la sangre circulante y la progresiva lisis, según nos situamos en capas más externas, evidenciando una topografía relacionada con los eventos temporales que van ocurriendo. El ILT se ve atravesado desde la cara luminal hacia la abluminal por una red de canalículos que permiten una penetración macromolecular no restrictiva³⁰.

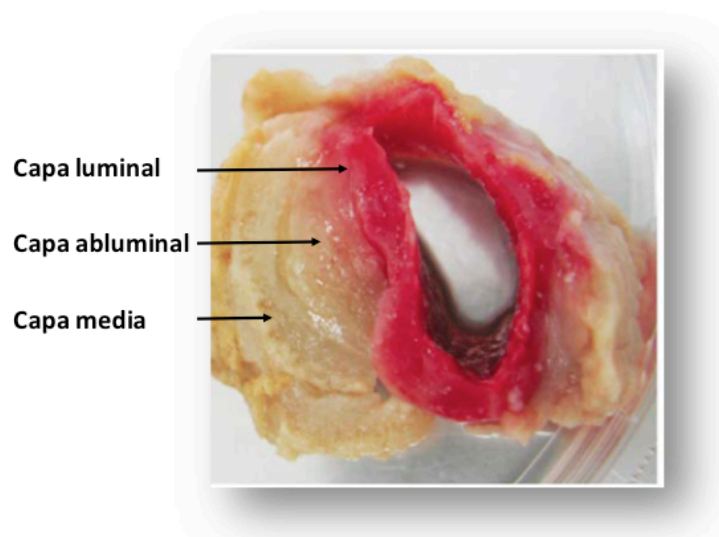


Figura 3: Diferentes capas del ILT humano. Adaptado de Michel JB et al. “Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans”. *Cardiovasc Res.* 2011.

La capa luminal es una capa activa caracterizada, por una parte, por la hemaglutinación de glóbulos rojos, proceso que libera Hb libre y, por otra, por la activación plaquetaria y de trombina, que generan la formación de fibrina. También ocurren en esta capa los procesos de retención de activador tisular del plasminógeno y de plasminógeno, encargados de la posterior fibrinólisis y, por último, la retención leucocitaria, siendo los neutrófilos las células mayoritarias en el ILT. Existe una relación entre plaquetas y neutrófilos, de manera que la inhibición de la agregación o de la activación plaquetaria parece limitar el crecimiento aneurismático ³¹ y estar asociado con una menor acumulación de neutrófilos dentro del ILT ³². Esto sugiere la relación entre la activación plaquetaria y el reclutamiento de neutrófilos. Estas células son reclutadas en el ILT por factores derivados tanto de ellas mismas como de plaquetas ³³. El ILT se convierte así en un modelo humano de interacciones entre plaquetas y neutrófilos, si bien la quimiotaxis de neutrófilos no se ve inducida únicamente por estos elementos celulares. Recientemente se ha demostrado cómo la retención de la fracción C3 del Complemento en el ILT -lo que a su vez se asocia con una reducción en los niveles sistémicos de C3- induce la retención y activación de células polimorfonucleares (PMN) ³⁴. La capa luminal es, sin duda, la capa más rica en elementos celulares ³⁵.

Actualmente existe la evidencia de que, independientemente de la localización, el ILT participa en la dilatación aneurismática ³⁶. La presencia del ILT se asocia con una pared arterial más fina, mayor elastolisis, menor densidad de células del músculo liso en la media y un nivel mayor de inmuno-inflamación en la adventicia ³⁷. Otras publicaciones observan una mayor degradación de aquella pared aneurismática en contacto directo con el ILT, que de las zonas adyacentes a la sangre circulante ³⁷. Con todo esto se sugiere que una importante parte de la actividad proteolítica se origina en el ILT.

Si bien la retención de plasminógeno y activador tisular del plasminógeno ocurre en la capa luminal del ILT, la fibrinólisis se retrasará espacial y temporalmente, comenzando en la capa abluminal y progresando a medida que nos alejamos de la luz arterial, de manera que la mayor actividad fibrinolítica ocurre en la interfaz entre el ILT y la pared arterial ³⁸. La plasmina no sólo se encarga de la proteólisis de la fibrina, también se encarga de activar MMP, movilizar el factor de crecimiento transformante β (TGF β) desde la matriz extracelular y degradar proteínas de adhesión como la fibronectina ³⁹.

Los neutrófilos presentan una alta afinidad por la vía fibrina-fibronectina, por lo que son mucho más numerosos en la formación de coágulos frente a la sangre circulante. Estas

células son capaces de incrementar tanto la coagulación como la fibrinólisis. Su presencia se asocia a un aumento en los niveles de MMP-8, MMP-9 y elastasa. Además, su presencia limita la capacidad de las células mesenquimales de colonizar el trombo, inhibiendo con ello el proceso endógeno de reparación ⁴⁰.

1.2.2 ILT y estrés oxidativo

Se puede definir el estrés oxidativo como un daño tisular que ocurre secundario a la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) o a su deficiente eliminación. Las ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS), han demostrado un papel causal en muchas enfermedades crónicas como la aterosclerosis o la hipertensión. La excesiva producción de ROS durante los procesos inflamatorios conlleva una situación de estrés oxidativo que ocasiona daño a nivel celular y tisular. El balance entre la producción y la eliminación de ROS no sólo depende de los sistemas encargados de su formación [por ejemplo, la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido oxidasa (NADPH oxidasa)], sino también de los niveles de antioxidantes celulares endógenos y de enzimas antioxidantes. Las evidencias apuntan a que un desequilibrio entre la producción y eliminación de ROS, resultantes en un aumento del estrés oxidativo, generan un daño tisular implicado en la patogénesis del AAA ²⁸.

Es sabido que el estrés oxidativo juega un papel importante en la aterosclerosis ⁴¹. Asimismo, durante muchos años, se investigó la posibilidad de que las ROS y las RNS pudieran estar implicados en la patogénesis del AAA. En 1987 Dubick et al. determinaron que los niveles de ácido ascórbico y la actividad de cobre, zinc superóxido dismutasa (SOD) estaban reducidos en muestras de pacientes con AAA y enfermedad oclusiva aortoiliaca, cuando se comparaban con aortas sanas ⁴². En estos mismos tejidos patológicos se objetivaron actividades reducidas de MnSOD (Manganeso superóxido dismutasa), glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, así como un incremento de productos relacionados con la peroxidación lipídica ⁴³. Por su parte, Zhang et al, mostraron cómo en la media y adventicia de tejido de aorta aneurismática humana, respecto a tejido de aorta sana, había una expresión incrementada de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) ⁴⁴. Con todo ello se sugería que en el AAA el ambiente local generado en la zona dañada provoca el estrés oxidativo.

Por otra parte, según lo comentado con anterioridad, los glóbulos rojos degradados desde la capa luminal hacia el exterior liberan Hb libre, un potente mediador prooxidante

⁴⁵ y hierro. Tanto el grupo hemo como el hierro pueden incrementar la capacidad oxidativa del entorno del AAA. La Hb está formada por 4 cadenas de globina, cada una de ellas asociada a un grupo hemo que contiene ion ferroso (Fe^{2+}). En el ambiente pro oxidante del trombo, la Hb-Fe^{2+} se oxida fácilmente, formando metahemoglobina con ion férrico (Fe^{3+}). El grupo hemo/ Fe^{3+} se disocia de las cadenas de globinas. Así, el Fe^{3+} del grupo hemo libera hierro libre hidrofóbico muy deletéreo. El exceso de hierro puede provocar aumento del estrés oxidativo a nivel local, ya que el hierro es un metal prooxidante capaz de generar ROS a través de la denominada reacción de Fenton (oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y generación de radical hidroxilo, OH^\cdot). Por otra parte, el hierro liberado atraerá macrófagos encargados de su fagocitosis algo que a su vez, perpetúa el estrés oxidativo como se expone a continuación.

Los leucocitos infiltrados y los macrófagos pueden generar grandes cantidades de anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y otras especies oxidantes (como H_2O_2) vía NADPH oxidasa unida a membranas. Los macrófagos y los neutrófilos del infiltrado inflamatorio contienen también mieloperoxidasa (MPO), capaz de iniciar la peroxidación lipídica. Las células musculares lisas, las células endoteliales y los fibroblastos también son capaces de generar $\text{O}_2^{\cdot-}$ por diferentes vías, lo que contribuye al estrés oxidativo ²⁵. Además, las células infiltrantes sintetizan citocinas proinflamatorias que, además de reclutar más linfocitos, inducen la actividad NADPH oxidasa de las células vasculares generando ROS. Las citocinas y las ROS inducen la apoptosis de las células de músculo liso favoreciendo la remodelación tisular y la expansión del AAA ²⁸.

Otros agentes intermedios del metabolismo que participan en la patogénesis de la aterosclerosis como la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa y el citocromo P450 podrían también contribuir a generar ROS en la pared vascular, aunque su papel en la formación y progresión del AAA no está demostrado ⁴⁶. Los factores de crecimiento como la angiotensina II (AngII) y el factor de crecimiento de plaquetas, moléculas intermedias del metabolismo de lípidos como leucotrienos y ácido lisofosfatídico y las LDL oxidadas, pueden activar la NADPH oxidasa ⁴⁷. Las fuerzas hemodinámicas y pulsátiles alteradas en el AAA pueden favorecer la producción de ROS vía NADPH oxidasa en células de músculo liso y exacerbar el estrés oxidativo y la inflamación. Por tanto, existe una compleja y estrecha relación entre inflamación y estrés oxidativo que parece muy relevante en la patogénesis del AAA.

1.2.3 Media patológica

La capa media de la arteria está formada por una matriz extracelular de fibras de colágeno y elastina, que determinan sus propiedades físicas y que interaccionan con las células musculares lisas. Cuando la matriz se rompe por degradación de las fibras de elastina y colágeno, conlleva un adelgazamiento de la capa media con su consiguiente dilatación y potencial rotura de la pared arterial ⁴⁸. Esta degradación la llevan a cabo principalmente las proteasas sintetizadas y almacenadas en el ILT y/o secretadas por las células inflamatorias de la adventicia, que pueden penetrar distribuyéndose por la red de neocapilares hacia la media aórtica ²⁵. La actividad de las enzimas proteolíticas, MMP y citocinas, provoca la pérdida de la red elástica y de la resistencia mecánica lo que, como se ha mencionado, permite la dilatación, la respuesta de reparación y la posible rotura posterior ⁴⁹. Los productos de degradación generados atraen de nuevo a leucocitos y macrófagos que penetran en el vaso, perpetuando la inflamación. Además, en un análisis histológico de la zona más externa de la media, encontramos la presencia de depósitos de cristales de colesterol ²⁵. Estos generarán la respuesta de macrófagos, células encargadas de su fagocitosis. Además, la inflamación que generan los cristales de colesterol, a través de la activación del inflamasoma NLRP3, podría perpetuar la inflamación. Así, la variabilidad genética en relación a este inflamasoma sería otro posible aspecto importante en cuanto a la fisiopatología del AAA ⁵⁰.

1.2.4 Adventicia e inflamación

La adventicia reacciona a las fuerzas centrífugas con tres respuestas: inmuno-inflamatoria, neoangiogénica y fibrótica.

A día de hoy existe la evidencia de que la inflamación tiene una importante relación con el AAA como se puede observar, por ejemplo, en el aumento en los niveles de Proteína C Reactiva (PCR) o en el incremento local de células inflamatorias, encontrando en la aorta patológica abundantes linfocitos y macrófagos. Pero la inflamación no sólo se asocia con la presencia del AAA, sino que posiblemente juega un papel en la patogénesis de la enfermedad ⁵¹. Existen varias posibilidades a través de las cuales esta respuesta inflamatoria puede jugar un importante papel en el desarrollo aneurismático. Los linfocitos son importantes fuentes de MMP y serán proteasas, que degradan proteínas estructurales como colágeno, elastina y laminina, provocando la degradación

de la pared aórtica ⁵². El papel de la proteólisis mediada por proteasas en la evolución del AAA fue puesto de manifiesto hace ya 30 años ⁴⁸. Este daño tisular puede ser exacerbado por el infiltrado de células inflamatorias mediante la liberación de citocinas [Interleucina 6 (IL-6), MCP-1, osteopontina] que favorecen el reclutamiento de más células del sistema inmunoinflamatorio, a través de la respuesta inmune adquirida, y también mediante la inducción de vías de muerte celular por apoptosis (Receptor Fas, perforina). Así se puede generar la muerte de células del músculo liso, responsables en gran parte de la producción de matriz extracelular en la aorta ⁵³. Además, incluso, las propias células de músculo liso al morir, pueden liberar proteasas. Esta degradación de proteínas estructurales, unida a la reducida capacidad para sintetizar nuevas proteínas de la matriz, conllevan el debilitamiento de la pared aórtica y su dilatación.

La neoangiogénesis que tiene lugar en la parte externa del AAA fue descrita con anterioridad ⁵⁴. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en trombos oclusivos o placas hemorrágicas, la neovascularización no invade el ILT, permaneciendo en la adventicia y la parte externa de la media, probablemente debido a un exceso de actividad proteolítica local. La principal función de los macrófagos en la adventicia es, probablemente, la fagocitosis. De esta manera, los productos de degradación de los glóbulos rojos se dirigen desde la capa luminal del ILT hasta la adventicia, donde son fagocitados ⁵⁵. Asimismo, la neoangiogénesis puede causar pequeñas hemorragias focales de manera que los eritrocitos liberados favorecerán el reclutamiento de más macrófagos a nivel de la adventicia. La respuesta inmune varía dependiendo del estado evolutivo del AAA, existiendo una notable cantidad de macrófagos, en la capa más interna adventicial, encargados de la fagocitosis del hierro liberado de la Hb que procede del ILT, tal como se ha expuesto, y generando una formación de órganos linfoides terciarios en las capas más externas, lo que proporciona evidencia del cambio de una inmunidad innata a la adquirida ²⁰.

Los fibroblastos juegan un papel importante en la respuesta de la adventicia ya que proliferan y secretan procolágeno-1, produciendo una fibrosis perivascular que proporciona resistencia a la rotura. Sin embargo, puede también producirse una fibrosis patológica en estructuras adyacentes. Así, la presencia de un infiltrado periaórtico en una base de tejido fibrótico, ha conducido al uso de los términos *AAA inflamatorio* y *fibrosis retroperitoneal* como diferentes entidades, y a identificar esta reacción adventicial como una respuesta inmune adquirida, no innata. El TGFβ sintetizado por

macrófagos y células inmunes es posiblemente el nexa molecular entre la inflamación y el proceso de reparación fibrótico ⁵⁶.

1.3 HDL, ApoA1 y PON1

1.3.1 HDL

La lipoproteína de alta densidad (HDL), es un complejo macromolecular implicado en el transporte y metabolismo de lípidos cuya función más estudiada es el transporte reverso de colesterol, es decir, el transporte de colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado para su excreción en forma de bilis y heces ⁵⁷. Todas las células necesitan colesterol; el exceso de colesterol que las células no pueden metabolizar, es expulsado mediante el eflujo de colesterol, mecanismo clave para la supervivencia de la célula y para evitar acumulación de colesterol en los tejidos periféricos, tal como ocurre en la aterosclerosis ⁵⁸.

La HDL se caracteriza por ser la lipoproteína más pequeña (diámetro: 5-17nm, peso molecular: 200-400KDa) y densa (>1,063g/ml). Está compuesta, aproximadamente, por un 50% de lípidos y un 50% de proteínas, entre las que se encuentran, junto a otras muchas, las proteínas paraoxonasa 1 (PON1) y apolipoproteína A1 (ApoA1) (*Figura 4*). Esta última constituye aproximadamente el 70% del contenido proteico de la partícula, y está presente en la práctica totalidad de las HDL ⁵⁹. Las diferentes subclases de HDL varían en cuanto al contenido de lípidos, apolipoproteínas, enzimas y proteínas transferidoras de lípidos, resultando en cambios de forma, densidad, tamaño, carga y antigenicidad ⁶⁰. Debido a la heterogeneidad de este tipo de partículas, no existe una única clasificación posible para las HDL. Las clasificaciones más usadas se basan en la forma, composición, tamaño, movilidad electroforética y densidad ⁶¹. La biosíntesis de la HDL es un proceso complejo que incluye la síntesis y secreción de las principales apolipoproteínas que componen la HDL, la adquisición de lípidos extracelulares (fosfolípidos y colesterol) y el ensamblaje, constituyendo la denominada HDL madura ⁶².

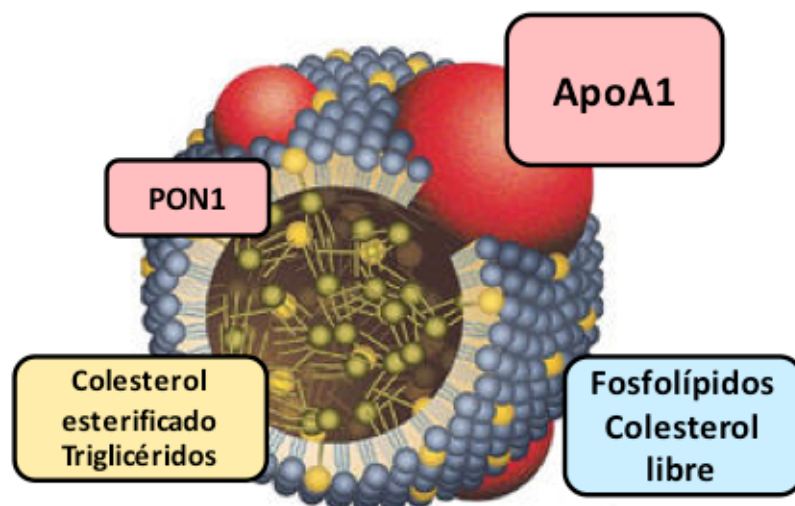


Figura 4: Composición de la partícula HDL.

Varios estudios han demostrado la relación inversa entre las cifras de HDLc y el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. En la cohorte de Framingham, se observó un aumento en el riesgo cardiovascular independiente de los valores de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDLc), especialmente en varones con HDLc menor de 25 mg/dl y en mujeres con HDLc menor de 35 mg/dl ⁶³. Recientemente, la revisión de cuatro grandes estudios epidemiológicos ha demostrado una disminución del 2-3% en la incidencia de eventos cardiovasculares por cada mg/dl de HDLc aumentado en sangre ⁶⁴. Esta misma relación inversa se ha identificado respecto a la presencia del AAA, lo que se expondrá con detalle posteriormente ⁶⁵. La HDL se convierte así en la única lipoproteína con valor predictivo en el riesgo de AAA, con un valor potencial como diana terapéutica ²³. La función más estudiada de la HDL es el transporte reverso de colesterol, y más específicamente el ya mencionado eflujo de colesterol de los macrófagos a la HDL. Este eflujo se ha planteado como un nuevo biomarcador relacionado de forma inversa con la incidencia de eventos cardiovasculares ⁶⁶. Sin embargo, a pesar de los resultados epidemiológicos, las intervenciones terapéuticas basadas en el aumento de la concentración de HDLc han sido infructuosas. Los ensayos controlados y randomizados en que se administraron dosis altas de niacina o inhibidores de la proteína que transfiere ésteres de colesterol (CETP) no mejoraron los eventos cardiovasculares, a pesar de incrementar los niveles de HDLc ^{67; 68}. Incluso, en un conocido ensayo, los resultados fueron un empeoramiento de la situación cardiovascular

de los pacientes ⁶⁹. Además, existen variantes genéticas asociadas con los niveles de HDLc que frecuentemente no se ven asociadas con problemas cardiovasculares ⁷⁰. Estas observaciones sugieren que el HDLc puede no estar asociado de forma causal con la enfermedad cardiovascular, haciendo ver las potenciales limitaciones de emplear el HDLc como valoración del riesgo cardiovascular o como diana terapéutica. Además de su papel en el transporte y metabolismo de lípidos, la partícula exhibe otras propiedades protectoras como son: propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antitrombóticas y protección del endotelio (*Figura 5*). En los últimos años se está produciendo un cambio de paradigma respecto al origen de la cardioprotección de la HDL. Si la concentración de HDLc no es la responsable de la protección de la partícula, quizá sean sus proteínas constituyentes las encargadas de su funcionalidad ⁷¹. De manera que estas funciones protectoras de la HDL no vienen dadas, o al menos únicamente no, por su contenido en colesterol y su relación con éste. Son dichas proteínas asociadas a la partícula, como ApoA1 y PON1, las responsables de lo que se denomina la funcionalidad de la partícula ⁵⁷. Con respecto a esto, publicaciones recientes han demostrado cómo el proteoma de la HDL puede adquirir un perfil proinflamatorio en determinadas condiciones patológicas como, por ejemplo, el síndrome coronario agudo. En estas circunstancias, el perfil proinflamatorio que adquiere la partícula HDL, hace que algunas de sus funciones pleiotrópicas se vean comprometidas ⁷². Todo esto apoya la teoría de que el estudio de las proteínas asociadas a la HDL puede ayudar a entender el espectro de propiedades antiaterogénicas que se le atribuyen. Por tanto, el objetivo para encontrar opciones de tratamiento eficaces basadas en la protección de la HDL, debe ir encaminado a la mejora de la funcionalidad de la partícula, basándose en sus constituyentes proteicos. Es fundamental, entonces, conocer en profundidad el proteoma de la HDL.

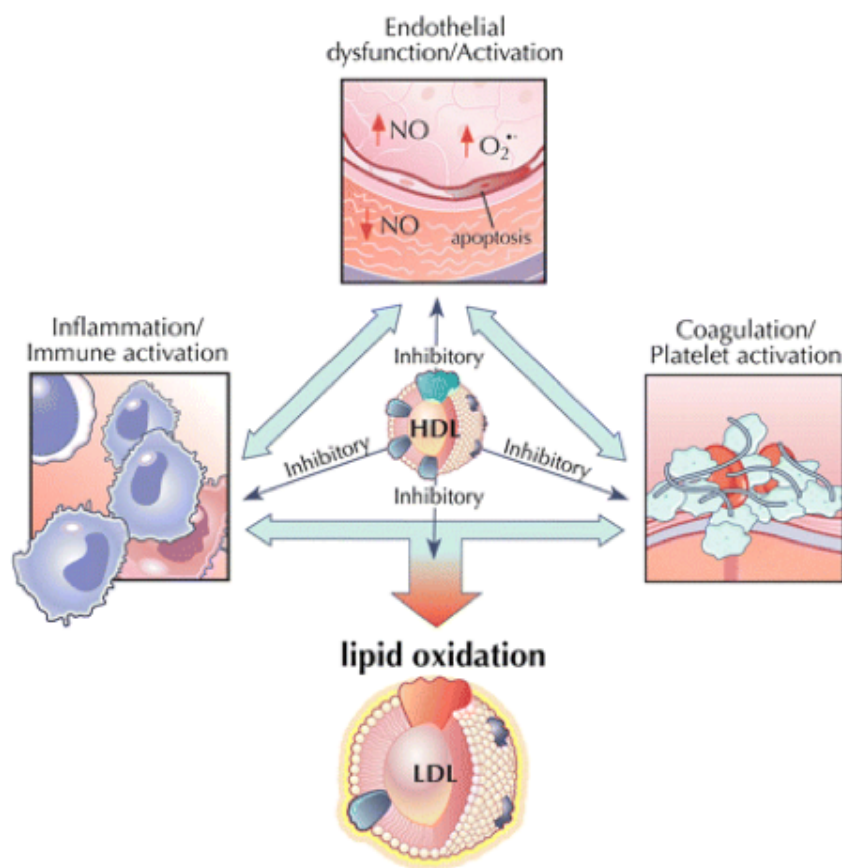


Figura 5: Funciones antiaterogénicas de la HDL. Tomado de deGoma EM et al. "Beyond High-Density Lipoprotein cholesterol levels evaluating High-Density Lipoprotein function as influenced by novel therapeutic approaches". JACC. 2008.

Se ha expuesto al comienzo de este apartado la conocida relación inversa entre el HDLc y la presencia del AAA^{23; 65}. Es conocida también la correlación negativa entre el tamaño aneurismático y la concentración en suero de HDL⁷³. Además de esto, según publicaciones recientes, el HDLc parece tener una relación con el volumen del ILT⁷⁴. El porcentaje de ILT respecto al total del volumen aórtico mostró una correlación negativa con los niveles en suero de HDLc. Mediante un análisis de regresión logística múltiple, los niveles de HDLc en suero, por debajo de la media, estaban asociados con un porcentaje de ILT en el cuartil superior, tras ajustar por factores de riesgo⁷⁴. Esto podría llevar a plantear como una posibilidad terapéutica futura, la elevación farmacológica del HDLc para frenar la progresión del AAA.

1.3.2 ApoA1

La ApoA1 es el componente proteico mayoritario de los que constituyen la molécula de HDL suponiendo, aproximadamente, el 70% del contenido de proteínas de la partícula. Así, la concentración plasmática de ApoA1 se correlaciona con la concentración de HDLc. La ApoA1 madura contiene ocho repeticiones en tándem de unidades de 22 aminoácidos, formando una α -hélice anfipática que permite que ApoA1 desempeñe sus principales actividades biológicas ⁷⁵. Se secreta principalmente en el hígado y en el intestino en forma de ApoA1 libre o pobre en lípidos ⁵⁹. Las HDL nacientes van adquiriendo lípidos a través del eflujo de colesterol y de la lipólisis de las lipoproteínas ricas en TG. La regulación de su síntesis ocurre fundamentalmente a nivel transcripcional, y se ve influida por agentes exógenos tales como: grasa de la dieta, ingesta de alcohol y hormonas como estrógenos u hormona tiroidea. Estudios realizados en ratones transgénicos con ApoA1 humana muestran que estos animales presentan elevadas concentraciones de HDLc y están protegidos frente a la aterosclerosis, sugiriendo que la sobreexpresión de ApoA1 es beneficiosa en ambos aspectos ⁷⁶. Las evidencias en la literatura reflejan que ApoA1 promueve la principal función de la HDL, que consiste en el transporte reverso del colesterol al hígado para su excreción. Pero también es responsable de acciones antioxidantes, antitrombóticas y antiinflamatorias como, por ejemplo, la inhibición de la adhesión de neutrófilos a fibronectina y la reducción del estrés oxidativo de estas células ⁷⁷. En un ambiente proinflamatorio y prooxidante, pueden ocurrir modificaciones en la composición de las HDL que inhiban su funcionalidad. En este sentido, se ha podido determinar que la oxidación de ApoA1 por la MPO resulta en la formación de partículas de HDL disfuncionales, con la pérdida de sus funciones cardioprotectoras ⁷⁸.

Desde 1996 se planteó la relación entre ApoA1 y otras apolipoproteínas con el AAA, demostrándose que los niveles de ApoA1 aparecían reducidos en este tipo de pacientes ²¹. Pero únicamente desde hace unos años se ha retomado el estudio de la relación entre ApoA1 y AAA. De forma congruente con la publicación anterior, y tal como se esperaba, se ha determinado recientemente cómo, comparando pacientes con AAA vs controles, la ApoA1 estaba significativamente reducida en el primero de los grupos, asociándose de manera independiente a la patología ⁷⁹.

1.3.3 PON1

La proteína PON1 es un enzima de 354 aminoácidos, y un peso molecular de 43 KDa. Es una estearasa y lactonasa transportada mayoritariamente por la HDL ⁸⁰. La mayor parte de PON1 circula asociada a la HDL y, dentro de ellas, preferentemente ligada a la HDL₃, aunque también se encuentran pequeñas cantidades en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y en los quilomicrones ⁸¹. Se ha sugerido la posibilidad de que PON1 pueda utilizar la VLDL como vehículo para introducirse en la HDL ⁸². La PON1 es sintetizada en el hígado y necesita a ApoA1 para su activación completa. Las partículas de HDL que transportan ApoA1 unen con gran afinidad a la enzima PON1. La proteína PON1 contribuye de forma importante en las actividades antioxidantes y antiinflamatorias de la partícula HDL. Las evidencias en la literatura apoyan este papel antioxidante de PON1, confiriéndole un papel cardioprotector y antiaterogénico. De esta forma, conocemos que PON1 inhibe la oxidación de las LDL ⁸³, hidroliza los lípidos oxidados, estimula la producción de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) mediada por la HDL, mejora el eflujo de colesterol de los macrófagos ⁸⁴ y se ha demostrado una menor incidencia de eventos cardiovasculares mayores en pacientes con una elevada actividad enzimática de PON1 ^{85; 86}.

1.4 MODELOS EXPERIMENTALES DE AAA

El desarrollo de modelos experimentales animales ha proporcionado nuevos conocimientos en la fisiopatología de distintas enfermedades, llegando a convertirse en herramientas esenciales para evaluar nuevas estrategias terapéuticas, prevenir posibles complicaciones y permitir la mejor comprensión de los aspectos relacionados con las distintas patologías. En ciertas enfermedades como el AAA, una detección temprana y la posibilidad de determinar su progresión son dos aspectos cruciales, a pesar de estar poco estudiados ⁸⁷. Por este motivo, los modelos animales del AAA son armas fundamentales para poder identificar nuevas estrategias terapéuticas capaces de suprimir la progresión aneurismática, además de permitir identificar y analizar características de los AAA humanos.

El modelo experimental murino es el principal para el estudio de las enfermedades cardiovasculares por diversas razones. Entre ellas se encuentran la facilidad en su manejo, el bajo coste y la capacidad disponible para manipular el genoma del ratón ⁸⁸.

Existen modelos basados en la modificación genética de importantes agentes moduladores de la integridad vascular, como los ratones deficientes en MMP-3⁸⁹, o en el inhibidor tisular de MMP-1⁹⁰, los cuales presentan espontáneamente degeneración de la capa media vascular. Sin embargo los más empleados son aquellos que inducen la formación del AAA mediante sustancias químicas, bien in situ con tratamiento con elastasa⁹¹ o por infusión de agentes hipertensivos.

1.4.1 AAA inducido por elastasa

El modelo de AAA inducido por elastasa fue adaptado para ratones de Pyo et al.⁹¹. La perfusión de elastasa en la aorta del ratón, causa una dilatación inicial leve-moderada. Sin embargo, a partir de los 14 días, la dilatación supera el 100% del diámetro aórtico. Este modelo se caracteriza por un retraso en la degradación de la media, por lo que la inflamación de la pared aórtica está formada principalmente por monocitos, con PMN en la adventicia⁹¹. El daño inducido por la elastasa aumenta la expresión de MMP, catepsinas, y otras proteasas, como MMP-9 en la zona de infiltración de los macrófagos⁹². Este modelo se ha convertido en una importante herramienta para evaluar el papel de los diferentes productos genómicos en la degeneración aneurismática⁹³.

La principal desventaja de este modelo es el estrés mecánico que se realiza a la hora de generar la degradación de la media. Pese a ello, el procedimiento refleja con bastante fiabilidad los eventos que ocurren en la degeneración aneurismática humana, espacial y temporalmente. Así, se genera un reclutamiento de leucocitos en las fases iniciales, se desarrolla una respuesta inflamatoria en la pared aórtica y ocurre una degradación de la elastina y el colágeno de la media. Todo ello conlleva una dilatación aórtica en su porción infrarrenal.

1.4.2 AAA inducido por angiotensina II

Este modelo se basa en la administración de 1000 ng/kg/min de AngII por vía subcutánea durante 28 días⁹⁴, generando un AAA con ciertas características comunes a los humanos, caracterizados por una degeneración de la capa media vascular y un severo infiltrado leucocitario.

Inicialmente este procedimiento se planteó como una forma de determinar si las concentraciones elevadas en plasma de AngII tenían un efecto directo en los procesos aterogénicos que se daban en ratones con delección en el gen de la apolipoproteína E

(ApoE -/-), de edad avanzada. De forma inesperada, la AngII produjo también un AAA en los ratones ⁹⁴. En este modelo, la inflamación de la pared del vaso se asocia con una señalización que ocurre a través de receptores de angiotensina AT1a y factor nuclear kappa B, inducción de numerosos genes proinflamatorios mediada por este último, inhibición de receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), activación de NADPH oxidasa, y reclutamiento de macrófagos y de enzimas proteolíticas, lo que lleva al vaso a su disección y rotura ⁹⁵. La severidad del AAA, cuando comparamos con ratones normolipidémicos de fondo genético C57Bl/6, es mayor en ratones ApoE -/- hipercolesterolémicos o en ratones machos con déficit del receptor para LDL, aunque en estos casos ni la hiperlipidemia ni la aterosclerosis, por sí mismos, son considerados determinantes mayores.

Este modelo fue determinante puesto que planteó la implicación del sistema renina-angiotensina en la patogénesis de la enfermedad aneurismática.

El principal inconveniente de este modelo reside en la localización del aneurisma que, en lugar de formarse a nivel infarrenal como la gran mayoría de los AAA en el humano, se origina por encima de las arterias renales. Por otro lado, la formación del AAA está relacionada con la interacción del sistema renina-angiotensina, un tema de estudio que aún presenta resultados controvertidos en el AAA humano. Sin embargo, este método aporta importantes ventajas. Por un lado reproduce las diferencias observadas entre géneros, siendo los machos mucho más sensibles al tratamiento con AngII que las hembras. Además, genera lesiones con un patrón de expresión de mediadores inflamatorios y MMP muy similar al humano. Todo esto, sumado a su fácil metodología, hace que sea uno de los modelos más empleados en el estudio del AAA.

Cada modelo tiene una serie de ventajas y desventajas que el investigador deberá tener en cuenta a la hora de elegir el mejor modelo experimental para su estudio. Ningún modelo es capaz de recrear de forma exacta lo que ocurre en el AAA humano. Por otra parte el investigador deberá tener en cuenta el presupuesto económico y los conocimientos para realizar correctamente la técnica del modelo, que deberá ser siempre reproducible. Pese a estas limitaciones, la amplia variedad de técnicas y de animales de que se dispone, hace que el estudio en modelos experimentales pueda plantearse como un arma de gran utilidad para analizar los mecanismos que subyacen al desarrollo del AAA.

1.5 BIOMARCADORES DEL AAA

Un biomarcador es una proteína, péptido, gen, lípido o producto metabólico que representa un proceso biológico en el cuerpo del que procede en un momento dado. Esto es algo útil a la hora de aplicarlo para evaluar la presencia o evolución de una enfermedad concreta. Además, la investigación y descubrimiento de nuevos marcadores ayuda a conocer y comprender mejor la fisiopatología de la enfermedad. Un biomarcador ideal debe cumplir una serie de características como son: presentar una relación causal con la enfermedad que señala, ser específico para esa enfermedad particular, estar implicado en las vías fisiopatológicas de dicha enfermedad y ser capaz de reflejar la severidad y progresión de la enfermedad ⁷.

Los biomarcadores circulantes del AAA es un tema de actualidad ⁹⁶. Actualmente no se conoce ningún marcador bioquímico del AAA con especificidad y sensibilidad suficientes como para poder ser utilizado en la práctica clínica. Sin embargo, la existencia de un marcador biológico podría ayudar a diagnosticar la enfermedad, a conocer su evolución y la respuesta al tratamiento de pacientes.

De acuerdo con la fisiopatología, los biomarcadores circulantes pueden ser clasificados en función de su relación con la actividad del ILT, la degradación de la matriz extracelular en la pared o la respuesta inmuno-inflamatoria de la adventicia. El descubrimiento de nuevos biomarcadores puede apoyarse en los conocimientos fisiopatológicos de la enfermedad o en nuevas tecnologías sin una hipótesis a priori como la proteómica.

Los primeros biomarcadores estaban relacionados de forma directa con la proteólisis de la matriz extracelular. Se ha demostrado que los péptidos de elastina y el propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III están elevados en suero de pacientes con AAA, sin embargo, presentan una baja sensibilidad y especificidad. ⁹⁶. Por ello, se optó por la medida directa de enzimas proteolíticas. Los complejos plasmina-antiplasmina (PAP) tienen una moderada sensibilidad en el AAA, asociados o no con productos de degradación de la fibrina. Recientemente se ha demostrado que los PAP y el dímero D se correlacionan con el diámetro aórtico, con el grosor del ILT, con el crecimiento aneurismático y también con un empeoramiento en la función pulmonar, en pacientes con AAA ⁹⁷.

Dado que los neutrófilos infiltran el ILT del AAA, podemos encontrar marcadores circulantes relacionados con su activación como son los complejos α 1-antitripsina-elastasa, MPO o α -defensina. Concretamente la MMP-9 puede usarse para monitorizar la eficacia del tratamiento ⁹⁸. Los niveles de la lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), liberada por PMN circulantes y por el propio ILT, se correlacionan con la presencia del AAA ⁹⁹.

Hay un aumento también de la activación plaquetaria en el AAA, como los complejos trombina-antitrombina circulantes en el plasma. La activación simultánea de marcadores relacionados con la coagulación y la fibrinólisis de forma simultánea muestra la evidencia de la actividad biológica del ILT. Sin embargo, respecto al estrés oxidativo, los marcadores circulantes relacionados con este proceso en el AAA aún deben ser identificados y valorados ¹⁰⁰.

Los biomarcadores relacionados con la inflamación, concretamente con la respuesta inmuno-adaptativa, también están elevados en pacientes con AAA, demostrando la asociación de un proceso inflamatorio con el desarrollo del AAA. Entre ellos encontramos: citocinas, factor de necrosis tumoral α (TNF α), IL-6 y PCR. También hay una manifiesta elevación de IgG4 e IgE ¹⁰¹.

Las evidencias más recientes, basadas en un estudio prospectivo de gran tamaño muestral, apoyan el hecho de que aquellos pacientes que combinan un mayor número de biomarcadores relacionados con AAA, se asocian de forma significativa y ajustando por factores de riesgo, con un incremento en la incidencia del AAA. Así, la presencia de varios biomarcadores relacionados con el AAA es capaz de determinar un grupo de pacientes de alto riesgo para el desarrollo del AAA ¹⁰².

El conocimiento limitado de la fisiopatología del AAA y la ausencia de marcadores fiables de expansión y rotura del mismo, hacen que la intervención invasiva sea la única opción terapéutica que se puede ofrecer hoy día a los pacientes. Actualmente, los parámetros determinantes de la necesidad de dicha intervención son el diámetro del AAA, su tasa de crecimiento, la morfología y otros signos de posible complicación del AAA y el riesgo quirúrgico del paciente. Por esto es fundamental poder profundizar y ampliar nuestros conocimientos en la fisiopatología del AAA, así como poder identificar biomarcadores de la existencia de AAA, de su tamaño y su crecimiento. Encontrar un biomarcador útil para los AAA es complicado, dado que se trata de una

enfermedad multifactorial con una fisiopatología compleja que no se conoce en su totalidad. De hecho, se han identificado varias moléculas circulantes elevadas en pacientes con AAA respecto a sujetos control, incluyendo lípidos, citocinas, elementos que conforman la matriz extracelular, factores de coagulación o proteasas. Pero ninguno de estos agentes tiene una aplicación directa en la práctica clínica. A pesar de ello, no hay duda de que la identificación de biomarcadores podrá ayudar en las decisiones clínicas, permitiéndonos conocer mejor la progresión de la enfermedad y abrir nuevas posibilidades terapéuticas, haciendo así un mejor y más temprano manejo de la enfermedad ⁷.

1.6 PROTEÓMICA

La proteómica es el conjunto de técnicas utilizadas en el estudio a gran escala de las proteínas. Permite la identificación de un conjunto de proteínas de un organismo, tanto en situación basal como patológica ¹⁰³. La proteómica se distingue de la genómica en la complejidad y variabilidad dinámica. Mientras el genoma es relativamente constante, el proteoma se encuentra en permanente cambio en función de las interacciones momentáneas que se crean entre el genoma y el ambiente. Se define proteoma como el conjunto de proteínas expresadas en una célula, un tejido o una partícula en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente ¹⁰⁴. La descripción del proteoma permite, por tanto, tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas, en dichas condiciones.

Uno de los principales usos de la proteómica en investigación biomédica es el estudio y comparación sistemáticos del proteoma en diferentes situaciones metabólicas y/o patológicas. Esto permite identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estadios fisiológicos, lo que ayuda a profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en ciertas enfermedades y permite obtener potenciales biomarcadores, mediante la comparativa entre sujetos sanos y pacientes, o pacientes en distintos estadios de la enfermedad ^{105;106}.

Es importante el estudio de las proteínas puesto que reflejan lo que está pasando en el organismo, es decir, nos ofrecen una realidad dinámica. En este sentido el papel del clínico es fundamental. En determinados casos, como los procesos agudos inflamatorios, puede haber proteínas en abundancia dada la situación clínica atravesada en ese momento que son consecuencia, y no causa, de la circunstancia del paciente. Es

importante conocer estos casos para elegir el mejor momento de estudio de un determinado paciente y optimizar las muestras y el tiempo disponibles ¹⁰⁷.

Las diferentes técnicas proteómicas permiten la separación y la cuantificación de las proteínas presentes en una mezcla compleja. Se pueden clasificar en técnicas basadas en gel y técnicas a gran escala no basadas en gel, directamente basadas en espectrometría de masas (MS) ¹⁰⁸.

1.6.1 Técnicas proteómicas basadas en gel

La técnica más empleada tradicionalmente ha sido la electroforesis bidimensional (EF 2D) ¹⁰⁹ y la posterior identificación de las proteínas de interés mediante MS ¹¹⁰.

La EF 2D es una técnica para la separación de mezclas complejas de proteínas con una gran capacidad resolutive. Consiste en la aplicación sucesiva de dos tipos de electroforesis realizadas sobre la misma muestra ¹⁰⁹. En la EF 2D, el tejido a estudio se solubiliza en tampones con detergentes que permitirán la posterior separación de cada proteína. La primera dimensión, se encarga de separar las proteínas en función de su punto isoeléctrico a través de un gradiente de pH, técnica ya desarrollada desde los años 70 ¹¹¹. La segunda dimensión es una electroforesis en gel de poliacrilamida que se realiza en presencia de un detergente, normalmente dodecilsulfato sódico. En este caso la separación se produce en función del peso molecular de cada proteína, siendo la dirección del movimiento de las proteínas en esta segunda etapa electroforética perpendicular a la primera. El gel 2D resultante se tiñe con colorantes específicos, se escanea y se digitaliza, de manera que se pueda obtener una imagen del conjunto de las proteínas presentes en la mezcla inicial ¹⁰⁶.

La electroforesis en gel con marcaje diferencial (DIGE) es una modificación de la EF 2D, con mejoras en cuanto a la reproducibilidad, la cuantificación y el tiempo en el análisis de los resultados ¹¹². Además, permite separar diferentes muestras en un mismo experimento.

1.6.2 Espectrometría de masas (MS)

La MS es una técnica analítica que emergió a finales de los años 80 para el análisis de proteínas ^{113; 114}, aunque se introdujo en el ámbito del análisis de biomoléculas al final

de la década de los años 70 ¹¹⁵, convirtiéndose rápidamente en uno de los métodos más utilizados en química analítica.

Mediante MS se determina la masa de las proteínas, posibilitando su identificación. Es una técnica sensible y precisa, capaz de determinar las masas moleculares de compuestos químicos o biológicos para su identificación ¹¹⁶.

El MALDI-TOF es una técnica de ionización suave utilizada en MS. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés *Time Of Flight* (tiempo de vuelo). Habitualmente se utiliza un equipo MALDI-TOF para la identificación de las proteínas analizadas por EF 2D ¹¹⁰.

1.6.3 Técnicas proteómicas a gran escala, no basadas en gel, acopladas con MS

Estas técnicas no basadas en gel, combinan la cromatografía líquida (LC) como método de separación con la MS, surgiendo así el LC-MS como la unión de ambas. Generalmente se acopla a la MS un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC). Estas técnicas se utilizan para el análisis de mezclas complejas de proteomas completos. Además, permiten analizar proteínas de características especiales (básicas, muy hidrofóbicas) que no se podrían analizar mediante EF 2D ¹¹⁷. Para el análisis utilizan preferentemente péptidos. Por ello, una vez se obtiene una determinada muestra, ésta debe ser digerida a través de una proteasa, de manera que se obtenga una mezcla de péptidos que se puedan analizar mediante este método ¹¹⁸.

La técnica LC-MS permite identificar de forma automatizada miles de péptidos y, comparando los espectros obtenidos con bases de datos establecidas, las proteínas de las que proceden. En este caso, el equipo de MS utilizado no será el mencionado MALDI-TOF, sino un espectrómetro de tipo trampa iónica de fiabilidad muy superior ^{106;119}.

Las técnicas proteómicas de última generación han evolucionado rápidamente en los últimos años y hoy en día existen diferentes métodos de marcaje que permiten la identificación y cuantificación simultánea de los péptidos. Los marcajes se clasifican en los de tipo químico (iTRAQ e ICAT, *Isotope-coded affinity tag*), enzimático (O¹⁸) y metabólico (SILAC, *Stable isotope labeling by aminoacids in cell culture*) ^{120;118}.

En esta Tesis Doctoral, se plantea la utilización de la proteómica de última generación como punto de partida en la búsqueda de biomarcadores, siguiendo el proceso que se describe en la *Figura 6*.

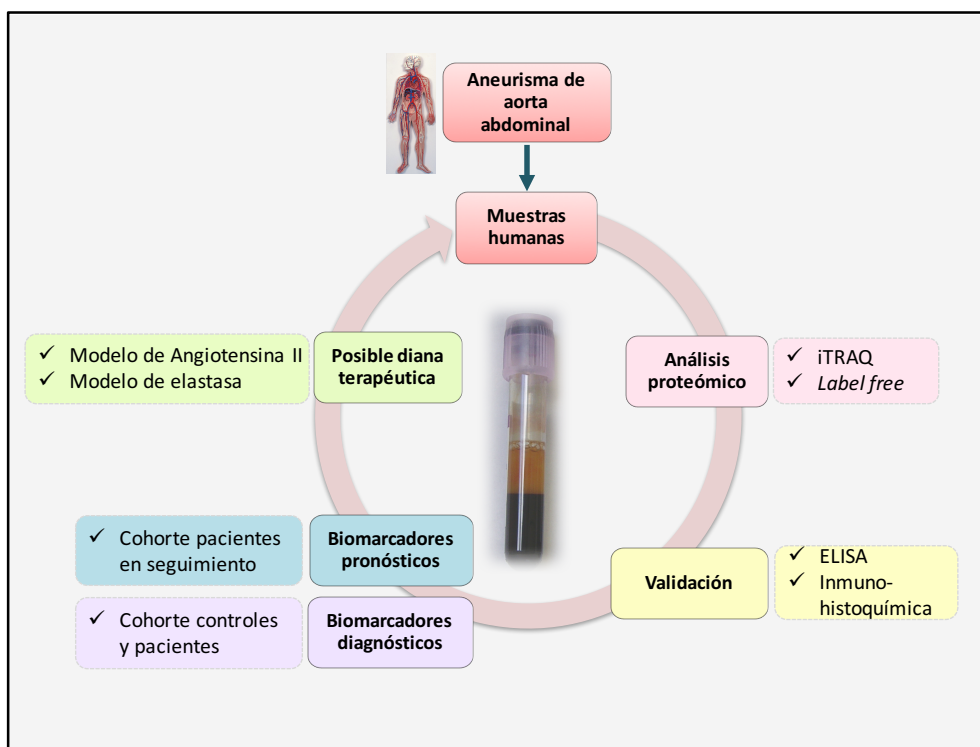


Figura 6. Proceso metodológico del estudio.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El AAA es una enfermedad de elevada prevalencia, sin embargo no son bien conocidos sus mecanismos fisiopatológicos. Además, el diagnóstico de esta enfermedad ocurre muchas veces de forma casual mediante pruebas de imagen derivadas del estudio o tratamiento de otra patología, y no existen biomarcadores que, de forma útil, permitan diagnosticarla. Respecto al seguimiento del AAA, se realiza únicamente mediante técnicas de imagen que registran sus diámetros seriados. Sin embargo, la evidencia muestra que el crecimiento de los AAA es en muchas ocasiones discontinuo e impredecible. Además, no existe actualmente farmacoterapia capaz de frenar la expansión y potencial rotura de los AAA.

La investigación sobre nuevos marcadores bioquímicos es de gran interés, tanto para alcanzar un conocimiento más profundo de los mecanismos biológicos que tienen lugar en la pared aórtica, como para su potencial uso en la práctica clínica habitual, bien como marcadores diagnósticos o pronósticos, o bien como posibles líneas de tratamiento farmacológico eficaz para este grupo de pacientes.

Las **hipótesis** planteadas fueron las siguientes:

- 1.- La identificación de nuevos biomarcadores mejorará el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con AAA en seguimiento y en rango quirúrgico. Las técnicas proteómicas de última generación son excelentes herramientas para la identificación de potenciales biomarcadores.
- 2.- La identificación de nuevas dianas terapéuticas para el AAA podría mejorar el tratamiento y la prevención del AAA.

Los **objetivos** de esta Tesis Doctoral son:

- 1.- Analizar mediante técnicas proteómicas el plasma de pacientes con AAA en diferentes estadios clínicos para la identificación de nuevos biomarcadores de AAA.
- 2.- Evaluar la asociación de los biomarcadores identificados con los marcadores clínicos del AAA utilizados actualmente. Evaluar la capacidad diagnóstica y/o pronóstica de dichos biomarcadores.
- 3.- Analizar la capacidad terapéutica de los nuevos biomarcadores identificados en modelos experimentales murinos de AAA

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PARTICIPANTES

3.1.1 Cohortes de los hospitales de Galdakao-Usansolo e IIS-FJD

A) Estudio ApoA1 (Galdakao)

Durante el examen clínico fueron reclutados del Hospital de Galdakao-Usansolo (Bizkaia, España) pacientes con AAA infrarrenal, fusiforme y asintomático, en seguimiento (tamaño aórtico=30-50 mm, n=90), y antes de la reparación quirúrgica (tamaño aórtico >50 mm, n=26). Asimismo, se reclutaron sujetos control (tamaño aórtico <30 mm, n=112), con similares características clínicas y demográficas. Se excluyeron aquellos pacientes que presentaban aneurisma sintomático, inflamatorio, de localización diferente al sector aórtico infrarrenal (yuxtarrenal, suprarrenal o toracoabdominal) así como los pacientes con aneurismas sincrónicos en otras localizaciones como arterias poplíteas, femorales o aorta torácica. De igual forma, se excluyeron del estudio pacientes con medicación corticoidea, inmunosupresora, o tratamiento crónico con antiinflamatorios no esteroideos y pacientes con procesos activos inflamatorios o infecciosos, intervenciones quirúrgicas o traumatismos graves 60 días antes del reclutamiento.

Mediante US o TAC, se midieron los mayores diámetros externos de la aorta abdominal infrarrenal, a nivel transversal, antero-posterior y lateral, perpendicularmente al eje aórtico. El diámetro aórtico de los sujetos control y de los pacientes con AAA comprendido entre 30-39 mm, se midió por ecografía abdominal con un ecógrafo Acuson Antares, SIEMENS, con sonda lineal PH4, en el Laboratorio Vascular del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital de Galdakao. Aquellos pacientes con AAA de 40-49 mm fueron controlados semestralmente con una TAC abdomino-pélvica, que se realizaba en el Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital de Galdakao. En los pacientes que presentaron trombo aórtico (n=81), se estimó el grosor del mismo sustrayendo el diámetro de la luz del máximo diámetro aórtico.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de todos los pacientes y controles el mismo día en que acudieron a la consulta y se les midió el diámetro del AAA. Dichas muestras de sangre venosa se recogieron en tubos con EDTA como anticoagulante (Vacutainer Becton Dickinson). La extracción de sangre se realizó entre las 8 y 10 horas de la mañana, tras un ayuno nocturno de 12 horas. Los tubos de muestra fueron centrifugados

durante 20 min a 2500 g. En ese momento, el plasma y el suero fueron inmediatamente congelados a -80°C . El Laboratorio de Bioquímica del Hospital de Galdakao está sometido al Programa de Garantía de Calidad Externo, de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) y el Programa de Gestión de Calidad de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (AEHH).

En las muestras de sangre periférica de pacientes y controles se determinaron las concentraciones de los parámetros del metabolismo lipídico por métodos estandarizados para análisis clínicos. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los controles y pacientes para su inclusión en el estudio. El protocolo del estudio se realizó conforme a las guías éticas de la Declaración de Helsinki de 1975, tal como se refleja en la aprobación previa del Comité Ético del Hospital de Galdakao.

Respecto a las variables clínicas, los grupos de pacientes y controles fueron normalizados por edad y sexo. La hipertensión fue definida como una presión arterial sistólica >140 mmHg y/o una presión diastólica ≥ 90 mmHg, medidas durante el examen clínico, después de que el paciente permaneciera sentado durante al menos 30 minutos, o bien sin este tiempo de espera si el paciente estaba tomando medicación hipotensora. Se consideró un paciente diabético si estaba bajo tratamiento (dieta supervisada, medicación oral hipoglucemiante o insulino terapia) o si se encontraba una cifra de glucemia >120 mg/dl y/o hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6,5$ %. La hipercolesterolemia fue definida como niveles totales basales de colesterol ≥ 200 mg/dl, niveles de LDL ≥ 100 mg/dl o si los pacientes estaban recibiendo medicación específica o una dieta supervisada. La enfermedad cardíaca incluyó enfermedad coronaria, valvular, miocardiopatías y arritmias. Respecto al tabaco, se consideraron sujetos con tabaquismo activo, aquellos que estaban fumando en el momento de inclusión en el estudio y sujetos no fumadores, los exfumadores y los que nunca habían fumado.

B) Estudio PON1 (Galdakao-IIS-FJD)

Se utilizaron muestras de dos cohortes, por una parte plasma de pacientes del Hospital de Galdakao para medir la concentración de PON1 y, por otra parte, sueros procedentes del biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD, Madrid, España) para medir la actividad de PON1. Las muestras de plasma incluyeron pacientes con AAA en seguimiento (diámetro aórtico 30-50 mm, $n=30$), AAA en rango quirúrgico (diámetro aórtico >50 mm, $n=21$) y controles (diámetro aórtico <30 mm,

n=26). Las muestras de suero incluyeron pacientes con AAA en seguimiento (diámetro aórtico 30-50 mm, n=15), AAA en rango quirúrgico (diámetro aórtico >50 mm, n=42) y controles (diámetro aórtico <30 mm, n=60). Con respecto a las variables clínicas, se emplearon los mismos criterios expuestos detalladamente en el primer estudio. Se recogieron muestras de sangre venosa en tubos de suero o con EDTA como anticoagulante, fueron centrifugados durante 20 min a 2500 g e, inmediatamente, el plasma o el suero fueron congelados a -80°C.

Al igual que en el estudio anterior, los protocolos del estudio se realizaron de acuerdo a las guías éticas de la Declaración de Helsinki de 1975, tal como se refleja en la aprobación previa por los Comités Éticos de los Hospitales de Galdakao y del IIS-FJD. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes y los controles para su inclusión.

3.1.2 Estudio Viborg

Se incluyeron 112 pacientes varones con AAA de diámetro >30 mm, en seguimiento, que habían sido diagnosticados en 1994. Estos pacientes fueron examinados, se determinó la concentración de HDLc al diagnóstico, se estudiaron mediante TAC anual y se propusieron para intervención quirúrgica si el AAA excedía los 50 mm de diámetro¹²¹. El estudio Viborg fue aprobado por las autoridades encargadas de la protección de datos y el Comité Ético Científico local. Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente y se realizó el protocolo del estudio conforme a las guías éticas de la Declaración de Helsinki de 1975, tal como queda de manifiesto en la aprobación previa por parte del Comité de Investigación Humana de la Institución (Número de aprobación del Comité 2-16-41-2-90).

3.1.3 Registro Vascular Danés

Se incluyó en el registro a todos los pacientes daneses sometidos a cirugía electiva de reconstrucción aortoiliaca, en el período comprendido entre 1990-2010, tanto por patología aterosclerótica como por AAA. Sin embargo, únicamente aquellos pacientes con claudicación intermitente moderada, dolor isquémico en reposo y AAA asintomático, fueron incluidos en el análisis, dado que en aquellos pacientes con heridas isquémicas o gangrena los niveles de colesterol están reducidos como consecuencia de

la respuesta inflamatoria, debida a la pérdida de tejido, excluyéndose por tanto del estudio.

Los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión fueron identificados con el Registro Vascular Danés, un registro clínico nacional que, tal como se ha mencionado, contiene información prospectiva desde 1990 hasta finales de 2010. En Dinamarca, es imprescindible para todos los departamentos de Cirugía Vascular incluir a los pacientes intervenidos quirúrgicamente en este registro, de manera que contiene el 99,2 % de todos los procedimientos vasculares.

En el Registro Vascular Danés fueron identificados 42507 casos, de los cuales 6560 correspondían a AAA asintomáticos y 23496 a casos de claudicación intermitente o dolor isquémico en reposo (enfermedad aortoiliaca oclusiva). El Registro Vascular Danés actúa de acuerdo a las guías éticas de la Declaración de Helsinki de 1975, tal como queda de manifiesto en la aprobación previa por parte del Comité Ético Científico local. La extracción de datos del Registro Vascular Danés no necesita aprobación ética, dado que no hay datos de identificación personal. Sólo incluye casos registrados.

3.2 ESTUDIOS PROTEÓMICOS

3.2.1 Muestras

Para el análisis proteómico, se utilizaron pacientes de la cohorte de Galdakao. Se recogió el plasma de ocho pacientes varones con AAA infrarrenal, de los cuales cuatro eran pacientes en seguimiento (diámetro aórtico de 30-50 mm) y 4 eran pacientes propuestos para cirugía (diámetro aórtico >50 mm). Asimismo se obtuvo el plasma de cuatro controles varones con aortas infrarrenales no dilatadas (diámetro aórtico <30 mm, confirmado mediante US abdominal) de un programa de *screening* que tuvo lugar en el área de seguimiento del Hospital de Galdakao. Los tres grupos se ajustaron en cuanto a sexo, edad y características clínicas.

3.2.2 Depleción del plasma

Se analizaron tres métodos de depleción diferentes: MARS14 (*Multiple Affinity Removal System Column*), Proteo-Miner y Sigma Y-14. La columna de afinidad MARS14 fue la más útil para la depleción de la mayor parte de las proteínas, aunque ninguno de los tres métodos analizados consiguió la depleción del 100% de las

proteínas abundantes (Figura 7). Las muestras de plasma fueron deplecionadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante y la fracción eluída se analizó mediante MS. Las fracciones de elución (cuatro fracciones por muestra) fueron dializadas con bicarbonato de amonio y, posteriormente, liofilizadas. A continuación, las proteínas fueron precipitadas utilizando el kit 2D clean-up (GE Healthcare, Madrid, España) y resuspendidas en Tris-HCl 30 mmol /l, pH 8,5, urea 7 mol/l, thiourea 2 mol/l, CHAPS 40 g/l. La concentración de proteína fue medida mediante RC-DC (BioRad, Hercules, CA, EEUU).

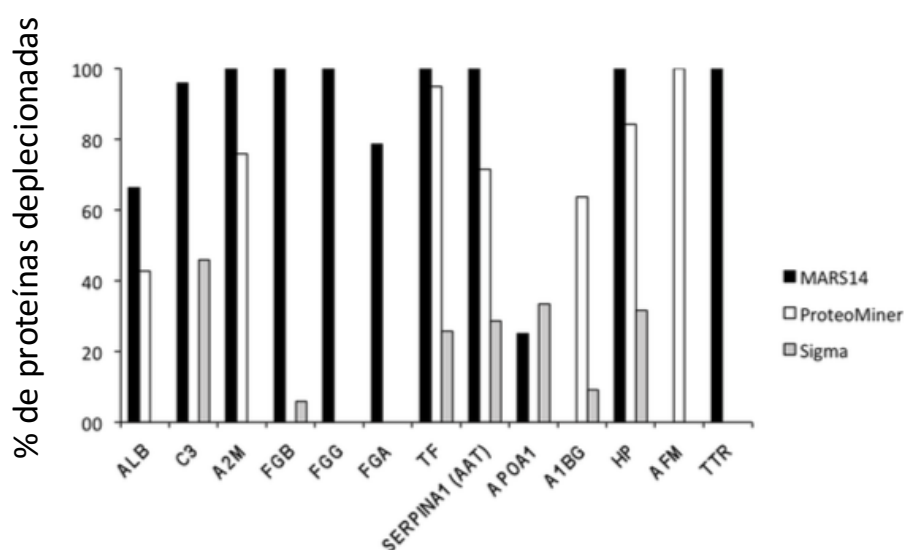


Figura 7: Porcentaje de proteínas deplecionadas en los tres métodos empleados. ALB: Albúmina, C3: fracción C3 del complemento, A2M: α -2-macroglobulina, FGB, FGG y FGA: Fibrinógeno (cadenas α , β , y γ), TF: Transferrina, SERPINA1 (AAT): Serpina 1 (α 1-antitripsina), APOA1: Apolipoproteína A1, A1BG: α -1B-glicoproteína, HP: Haptoglobina, AFM: Afamina, TTR: Transtirretina.

3.2.3 Análisis mediante marcaje iTRAQ e identificación por LC-MS/MS

Se trataron 50 μ g de proteína con 5 mM Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) durante una hora a 60°C y, posteriormente, se alquilaron utilizando 10 mM s-metilmetenotiosulfonato (MMTS) a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, las proteínas fueron digeridas con tripsina porcina, durante 5 h a 37°C, utilizando un ratio 1:50 de tripsina frente a proteína. Las muestras digeridas fueron marcadas con los reactivos de iTRAQ, según el protocolo del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), utilizando un vial de reactivo de iTRAQ por cada

50 µg de extracto proteico. La reacción fue inactivada añadiendo 3 µl de ácido acético. El estudio fue realizado en seis grupos experimentales y las muestras fueron etiquetadas utilizando el correspondiente marcador iTRAQ.

Las muestras marcadas fueron mezcladas en un ratio 1:1 y los péptidos mezclados resultantes fueron separados mediante LC acoplada al MS para la identificación proteica. Los péptidos fueron inyectados en una micro-precolumna (500 µm I.D. y 15 mm BioX-SCX TM, LC Packings, Amsterdam, Holanda) de intercambio catiónico (SCX), con un flujo de 30 µl/min, como primera dimensión de separación. Los péptidos se eluyeron de la columna como fracciones, inyectando acetato de amonio a concentraciones crecientes en tres etapas (10, 100 y 200 mM). Cada una de la tres fracciones, junto con las fracciones no retenidas, fueron inyectadas en una nanocolumna (100 mm I.D. y 12 cm, Mediterranea sea, Teknokroma, Barcelona, España) de fase reversa (RP) C-18, y analizados en un gradiente continuo de acetonitrilo realizado de la siguiente manera: 0-50% B durante 90 min, 50-90% B durante 1 min, siendo los componentes de B, 95% de acetonitrilo y 0,5% de ácido acético, en un sistema Dionex-UltiMate 3000 LC System. Se utilizó un flujo de 300 nl/min para eluir los péptidos desde la nanocolumna RP al espectrómetro de masas de tipo LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher, Waltham, MA, EEUU). Mediante una cromatografía de 130 min, se analizó el espectro de resolución (resolución=30.000) con la transformada de Fourier (FT) mejorada, seguido por el espectro de los tres iones primarios de mayor intensidad, mediante MS/MS (la disociación se realizó utilizando dos activaciones diferentes, la disociación por colisión de alta energía y la disociación inducida mediante colisión). La exclusión dinámica se fijó a 1 min.

La identificación proteica se llevó a cabo utilizando el algoritmo Sequest (Bioworks 3.2 package, Thermo Finnigan), que permitió modificaciones opcionales (oxidación de metionina, fosforilación de treonina y serina, marcaje de +144.1020 Da en tirosina y lisina, mediante iTRAQ-4plex) y fijas (marcaje de +144.1020 Da de carboxamidametilación y N-terminal cisteína, mediante iTRAQ-4plex). Los archivos con los datos crudos del MS/MS se cruzaron con la base de datos Human Swissprot (Uniprot release 2011.08), complementados con la secuencia de tripsina porcina. Los archivos crudos también se cruzaron con la base de datos invertida, construida desde la misma base de datos diana. Los resultados Sequest fueron analizados utilizando el

método de probabilidad de ratio ¹²², y la tasa falsa de identificación de péptidos fue calculada mediante los resultados buscados con la base de datos invertida ¹²³.

La cuantificación de los péptidos se realizó mediante QuiXoT, un programa escrito en C# en el laboratorio de proteómica del CNIC (Dr. Jesús Vázquez). El análisis estadístico de los datos se basó en un nuevo modelo de efectos randomizados, desarrollado en el laboratorio, que incluye cuatro niveles diferentes de fuentes de variación: espectro, scan, péptido y proteína ¹²⁴. Los detalles sobre el modelo estadístico y el algoritmo utilizado para calcular las diferencias en el examen, niveles de péptidos y de proteínas, se pueden encontrar en trabajos previos ^{124; 125}.

3.2.4 Análisis sin marcaje e identificación por LC-MS/MS

Los péptidos tripticos fueron inyectados en una nano-columna C18 de RP (I.D. 100 mm y Mediterranea sea, Teknokroma, 12 cm) y analizados en un gradiente continuo de acetonitrilo consistente en 0-50% B durante 90 min y 50-90% B durante 1 min, siendo B=95% acetonitrilo y 0,5% de ácido acético. Los péptidos se eluyeron de la nano-columna RP con un flujo de 300 nl/min y se fragmentaron en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher).

Los espectros de masas se extrajeron del software Proteome Discoverer v1.0 (Thermo Fisher). Para la identificación proteica, se hizo una búsqueda del espectro fragmentado en una base de datos humana (Human_ref.fasta; 2003, Abril; 39414 entradas), utilizando los sistemas Sequest (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EEUU; versión 1.0.43.2) y X-Tandem (The GPM, thegpm.org; versión 2007.01.01.1). Las búsquedas en Sequest y X-Tandem se realizaron permitiendo dos puntos de digestión perdidos, y se fijó una tolerancia de 15 ppm o 0,8 Da para las búsquedas del espectro completo de MS o MS/MS, respectivamente. Se permitieron como modificaciones variables la alquilación con tiosulfato de metano de los residuos de cisteína, la oxidación de metionina y la fosforilación de los residuos de serina y treonina.

Para validar la identificación de péptidos y proteínas, se utilizó el software Scaffold v.3.00.02 (Proteome Software Inc, Portland, Oregon). Los péptidos identificados fueron aceptados si se podían establecer con más de un 80% de probabilidad y las proteínas identificadas lo fueron si se podían establecer con más de un 80% de probabilidad y contenían, al menos, un péptido identificado, tal como se especifica en los algoritmos Peptide Prophet ¹²⁶ y Protein Prophet ¹²⁷, respectivamente. Aquellas proteínas que

contenían péptidos similares y que no podían ser diferenciadas únicamente basándose en el análisis MS/MS, fueron agrupadas para satisfacer los principios de parsimonia.

Dado que el número de conteo espectral de una proteína puede utilizarse como una medida de su abundancia ¹²⁸, se utilizó la distribución β -binomial para determinar la significación estadística de las diferencias de abundancia proteica (según lo previsto por el software Scaffold) mediante un software disponible públicamente ¹²⁹. Se consideraron significativas aquellas diferencias con valor de $p < 0,05$. Los datos de conteo espectral se normalizaron mediante cuantiles ¹³⁰ para calcular la media correspondiente a los cambios de los ratios.

3.3 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

La proteína ApoA1 fue medida mediante análisis inmunturbidimétrico, utilizando el analizador Cobas 711 (Diagnósticos Roche, Basel, Suiza).

La concentración soluble de PON1 en muestras humanas, se midió con un kit comercial de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (SK00141-01, Aviscera Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La actividad arilesterasa de PON1 se midió utilizando fenilacetato como sustrato, tanto en las muestras humanas como en las murinas. Las tasas iniciales de hidrólisis se determinaron espectrofotométricamente a 275 nm cada 15 s, durante 2 min. La mezcla del ensayo incluyó 2 μ l de suero al que se añadió la mezcla de reacción compuesta por 1 mmol de fenilacetato y 1 mM de CaCl_2 en 50 mM de TrisHCl, a un pH de 8.0. El E_{270} para la reacción fue de $1310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Una unidad de actividad de arilesterasa es equivalente a 1 mmol de fenilacetato hidrolizado por minuto y mililitro ¹³¹.

3.4 MODELOS EXPERIMENTALES

3.4.1 Modelo de infusión con angiotensina II

Se empleó el modelo de AngII en 25 ratones de 8 semanas, tal como se describe previamente ⁹⁴. Se implantaron pequeñas bombas osmóticas (Alzet Corp, Cupertino, CA, EEUU), subcutáneas, a una dosis de 1 $\mu\text{g/kg/min}$ durante 28 días, en ratones ApoE -/- (fondo genético C57BL/6). Los ratones fueron anestesiados con isoflurano al 2%, siendo la dosis de infusión de AngII de 1 $\mu\text{g/kg}$ por minuto, durante 28 días. Los ratones

se aleatorizaron en dos grupos, uno al que se inyectó el péptido D4F intraperitonealmente, cada 2 días, a una concentración previamente probada (4 mg/kg cada 2 días, n=13)¹³² durante la progresión del modelo, otro al que se inyectó salino, en las mismas condiciones (n=12). D4F es un péptido mimético de la proteína ApoA1 compuesto por 18 aminoácidos D, diseñado para contener una hélice anfipática de clase A, con una cara polar y otra apolar, lo que le permite unir lípidos de forma similar a como lo hace la ApoA1¹³³.

La progresión del AAA fue monitorizada por ultrasonidos de alta frecuencia con el sistema VEVO770, tal como se describe previamente¹³⁴. En cada animal se visualizó la aorta abdominal completa, en corte longitudinal, y el diámetro aórtico máximo fue calculado como la media de un mínimo de cuatro medidas de la región aórtica que presentaba una mayor dilatación. Las imágenes por ultrasonido fueron obtenidas en condiciones basales (t=0 días) y 2, 6, 9, 15, 22 y 28 días, tras el implante de la bomba de AngII. Todos los animales recibieron cuidados humanos y los protocolos del estudio cumplieron con las guías del instituto CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares). El proyecto animal fue autorizado por el Comité Ético del CNIC (CNIC-05/14), por un Comité Ético externo (Universidad Autónoma de Madrid, CEI 55-994-A041) y por la Autoridad legal competente en experimentación animal española (Comunidad Autónoma de Madrid, registro de carta de aprobación 10/167531.9/14).

3.4.2 Modelo de perfusión con elastasa

Se utilizaron ratones transgénicos que sobreexpresaban la proteína humana PON1 (HuTgPON1, n=12), aportados generosamente por el Dr. Michel Aviram, y controles salvajes (WT, procedentes de la cepa C57BL/6, n=12).^{91; 135}. El modelo de perfusión de elastasa se lleva a cabo tal como se describe a continuación, en ratones de 12 semanas⁹². Se anestesia al ratón de forma inhalatoria con isoflurano al 2%, se realiza una laparotomía media del animal y se aísla la aorta abdominal desde la vena renal izquierda hasta la bifurcación ilíaca. Se colocan pequeños *clamps* temporales proximal y distalmente en la aorta (*Figura 8A*), y se crea una aortotomía con una aguja de 3F. Se introduce un tubo de polietileno a través de la aortotomía, y se fija con una seda. La aorta se llena entonces con solución salina conteniendo 0,414 U/ml de elastasa pancreática porcina tipo I (E1250, Sigma, con actividad específica 5 U/mg proteína). Típicamente la aorta se dilata entre 50-70% durante los 5 minutos que dura la perfusión

de elastasa, independientemente de la solución introducida. En este momento ya se retira el catéter de perfusión, y la aortotomía se cierra, con una sutura de 10/0 o con Histoacryl, para evitar la estenosis del vaso. Finalmente, se procede, por planos, al cierre de la pared abdominal (*Figura 8B*). Pasados 14 días, se procede al sacrificio del animal.

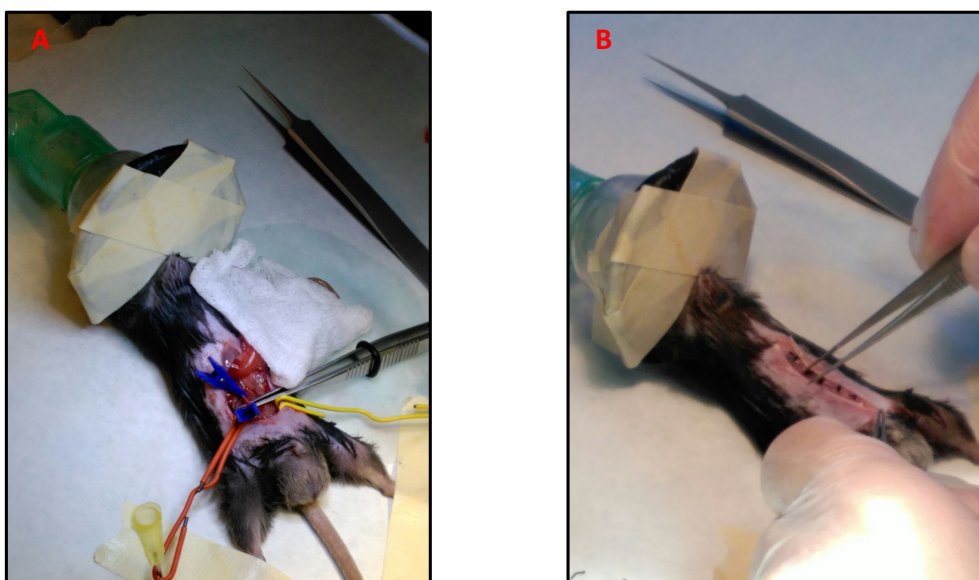


Figura 8: Modelo de AAA experimental por infusión de elastasa. A.- Clampaje de la aorta infrarrenal. B.- Cierre por planos de la pared abdominal.

En este modelo, se define AAA como un crecimiento del diámetro aórtico $\geq 100\%$ al diámetro previo a la perfusión de elastasa ⁹¹. Una vez pasados 14 días tras dicha perfusión, los tejidos del AAA se incluyeron en OCT o parafina, para su procesamiento. Se determinaron los diámetros aórticos y se midió la proporción de células del músculo liso vascular (CMLV), macrófagos, MCP-1, elastina y tasa de apoptosis, mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Todos los ratones se mantuvieron en condiciones de aislamiento. En todo momento hubo disponibilidad de agua y de nutrición mediante la dieta habitual en el laboratorio. Todos los animales recibieron cuidados humanos. La investigación se llevó a cabo de acuerdo a las guías de la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo sobre la protección de animales, utilizado para propósitos científicos, y fue aprobada por nuestro Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los animales (IIS-Fundación Jiménez Díaz).

3.5 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS E INMUNO-HISTOQUÍMICOS

3.5.1 Muestras humanas

Se recogieron diez muestras de tejido de AAA en pacientes que habían sido intervenidos en IIS-FJD (Número PIC 31/2011 del Comité Ético de IIS-FJD). Además, se consiguieron diez aortas control procedentes de autopsias, mediante la autorización de la Agencia Francesa de Biomedicina (PFS 09-007). Estas aortas control resultaron normales macroscópicamente, sin evidenciarse lesiones correspondientes a patología aterosclerótica incipiente. Las muestras de tejido de la pared y trombo del AAA, así como la pared de las aortas control, fueron fijadas en paraformaldehído al 3,7%, incluidas en parafina y seccionadas en cortes de 6 μ m. A continuación, se eliminó la parafina de las secciones y fueron hidratadas. Se utilizó como anticuerpo primario el anti-apolipoproteína A1 (anti-ApoA1) (Meridian Life Science, Memphis, TN, EEUU) o el anti-paraoxonasa 1 (anti-PON1) (ab24261 Abcam) y se empleó una inmunoglobulina irrelevante (Dako, Glostrup, Dinamarca), en igual concentración, para determinar las tinciones no específicas. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina.

3.5.2 Muestras experimentales

Las muestras de AAA experimental fueron incluidas en OCT o parafina y seccionadas en piezas de 5 μ m de grosor. El análisis inmunohistoquímico se realizó en todos los animales incluidos en cada grupo, utilizando como anticuerpos primarios el marcador de macrófagos peritoneales de ratón CD68 (ab53444, Abcam), la MCP-1 (sc-1785, Santa Cruz), la actina como marcador de CMLV (Clone 1A4, Sigma), el marcador de neutrófilos Ly-6B.2 (MCA7716A, AbD Serotec), el marcador de linfocitos CD3 (A0452, Dako) y el marcador de apoptosis *cleaved*-PARP [Poli (ADP-ribosa) polimerasa] (ab32064, Abcam). Se añadieron el anticuerpo secundario y el ABCComplex y se tiñeron las secciones con 3,30-diaminobencidina o 3-amino-9-etilcarbamil, realizando una contratinción con hematoxilina y fijando en DPX o medio acuoso, respectivamente. El análisis morfométrico por ordenador se realizó basándose en el software Image-Pro Plus (versión 1.0 para Windows). El límite establecido para la medida del área fue similar en todas las imágenes. Las muestras procedentes de cada animal fueron examinadas de forma ciega. Los resultados se expresaron como porcentaje de área positiva respecto al total del área, en el caso de macrófagos,

neutrófilos y MCP-1, y como células positivas por milímetro cuadrado del total de la lesión, para CD3 y *cleaved*-PARP.

Para la determinación morfológica de la lesión se realizó la tinción de Verhoeff Van Gieson utilizando el kit Elastic Stain (Sigma-Aldrich, HT25A-1KT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fragmentación de elastina y el contenido de CMLV fueron clasificadas tal como se describe previamente^{135; 136}. De forma breve, la preservación de elastina se clasificó de la siguiente manera: grado 1, intacta, láminas de elastina bien organizadas; grado 2, láminas de elastina con algunas interrupciones y huecos; grado 3, láminas de elastina con múltiples interrupciones y huecos; grado 4, fragmentación severa de elastina o pérdida completa. El contenido de CMLV en la capa media se clasificó de la siguiente forma: grado 1, CMLV intactas; grado 2, mínimas anomalías; grado 3, pérdidas de algunas CMLV; grado 4, pérdida de CMLV en áreas amplias de la capa media. En base a esto, el grado mayor indicó una peor preservación de las CMLV.

3.6 ESTADÍSTICA

La normalización de los datos de pacientes se realizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y celdas de probabilidad. La distribución normal de las concentraciones de ApoA1 y PON1 fue expresada como la media \pm error estándar (EE). Las comparaciones entre grupos fueron realizadas mediante los test de chi-cuadrado en el caso de variables categóricas, mientras que las variables continuas fueron analizadas mediante t-Student. La concentración y/o actividad de PON1 se transformó en una variable categórica dividiendo sus niveles por debajo o por encima de la media.

Las asociaciones univariantes entre ApoA1/HDLc y el tamaño aórtico, así como el volumen del trombo, fueron realizadas mediante el test de correlación de Pearson. Se llevó a cabo un análisis de regresión lineal multivariante con el tamaño del AAA y el trombo como variables dependientes, incluyendo en el modelo los factores de riesgo tradicionales. Utilizando los datos del Registro Vascular Danés, la concentración de HDLc fue expresada como la media \pm desviación estándar (DE). Mediante el test de t-Student se hizo un análisis en los casos de enfermedad oclusiva aortoiliaca y de AAA, con el fin de evaluar una asociación univariante. Asimismo se identificaron otras variables como potenciales factores de confusión, para ajustar por ellos en un análisis de regresión lineal múltiple. Las tasas de expansión individual en el estudio Viborg fueron

calculadas a través de un análisis de regresión lineal. El test t-Student y la correlación bivalente de Pearson fueron utilizados para identificar posibles factores de confusión en las asociaciones entre HDLc y crecimiento, que fueron utilizados en un análisis de regresión lineal múltiple. Estos potenciales factores también fueron utilizados en el análisis de regresión de Cox, en relación a la asociación entre la necesidad de reparación quirúrgica posterior y la concentración de HDLc, por encima y por debajo de la media. Los análisis de regresión logística multivariante de PON1, incluyeron sólo variables que resultaron estadísticamente significativas en el análisis univariante realizado en la búsqueda de predictores de presencia de AAA. Los análisis de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) se utilizaron para discriminar entre pacientes y controles, considerando la hipótesis nula cuando el área bajo la curva fue de 0,5.

Para el modelo experimental de ApoA1, el efecto del tratamiento en el diámetro aórtico en función del tiempo se analizó utilizando el test de Anova de dos colas. Para el modelo experimental de PON1, el efecto de la sobreexpresión de PON1 a tiempo final (14 días) se analizó mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Como software estadístico se utilizaron EpiData y SPSS 15.0.

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDIO ApoA1

4.1.1 Análisis por iTRAQ de plasma de pacientes con AAA

Las características clínicas de las muestras de plasma humano utilizadas para el análisis proteómico son similares a las del estudio de validación, presentadas a continuación en la *Tabla 1*.

Tabla 1: Características clínicas y demográficas de los grupos estudiados en la cohorte del H. Galdakao (Bizkaia, España).

VARIABLES CLÍNICAS			
	Grupo control	AAA 3-5cm	AAA >5cm
Número	112	90	26
Sexo (hombre/mujer)	112/0	87/3	26/0
Edad (años \pm DE)	64,9 \pm 0,2	69,6 \pm 7,9 *	72,1 \pm 8,3 *
Dislipemia (%)	50,8	57	54
Tabaquismo activo (%)	8	34 *	42 *
Diabetes Mellitus (%)	8,9	16	15
Hipertensión (%)	15,2	69 *	81 *
Enfermedad cardiovascular (%)	8,9	32 *	23 *
Tratamiento hipolipemiante (estatinas) (%)	9	55 *	50 *

* $p < 0,001$ respecto al grupo control

Las muestras de plasma se sometieron a la columna de inmunoafinidad MARS14 y las proteínas de la fracción de elución se compararon utilizando el método de marcaje iTRAQ. Las muestras de los pacientes y los controles se marcaron aleatoriamente con los diferentes reactivos iTRAQ (114, 115, 116 y 117) para evitar sesgos. Se utilizó un total de seis grupos emparejados para el análisis de cuantificación iTRAQ. Teniendo en cuenta sólo aquellos resultados con FDR (*False Discovery Rate*) $< 5\%$, se identificaron entre 813 y 1133 espectros de MS/MS, entre 416 y 534 péptidos únicos y entre 101 y 196 proteínas. En cada experimento, los espectros de MS/MS correspondientes a 418-763 pudieron ser cuantificados, correspondiendo a 294-474 péptidos únicos y a 79-138 proteínas.

En cada uno de los experimentos se estudió, de forma separada, el análisis proteómico cuantitativo entre pacientes con AAA en dos estadios evolutivos diferentes y controles. Pese a la variabilidad biológica y las potenciales variaciones introducidas durante la manipulación de las muestras, los resultados cuantitativos fueron altamente

reproducibles entre los distintos experimentos, con una proporción muy baja de cuantificaciones atípicas y manteniendo las diferencias dentro de los estándares esperados^{125; 137; 138}. El patrón de las alteraciones de las proteínas encontrado en pacientes con AAA fue detectado, en general, de una manera reproducible. Así, la mayoría de las proteínas aparecían aumentadas (celdas verdes) o disminuidas (celdas rojas) en todas las réplicas de forma significativa (*Figuras 9, 10 y 11*).

		Corrected log2-ratio (Xq _e -X _e)					Fold change	Standardized normal value (Zq _e)					FDRq ^a
Uniprot	Protein Name	A	B	D	E	All		A	B	D	E	All	
P02647	Apolipoprotein A-I	-2.25	-0.06	-1.79	0.238	-1.61	3.05	-7.64	-0.048	-5.578	0.4973	-8.27	3E-14
P02652	Apolipoprotein A-II	-2.67	-0.61	-1.13	0.088	-1.60	3.03	-8.195	-0.476	-3.206	0.1622	-7.43	7E-12
Q62QQ6	WD repeat-containing protein 87	-0.73			-1.83	-0.97	1.95	-2.012			-2.67	-3.03	0.0715
P02679	Fibrinogen gamma chain	-0.77	0.124	-0.56	-0.09	-0.58	1.50	-2.534	0.0965	-1.592	-0.152	-2.75	0.1358
P06727	Apolipoprotein A-IV	-0.47	-1.22	-0.69	0.051	-0.49	1.40	-1.608	-1.052	-2.192	0.1063	-2.54	0.2065
P02671	Fibrinogen alpha chain	-0.75	0.293	-0.28	-0.06	-0.43	1.35	-2.563	0.2505	-0.867	-0.128	-2.25	0.3917
P04114	Apolipoprotein B-100	-0.12	-0.68	-0.65	-0.32	-0.37	1.29	-0.421	-0.6	-2.155	-0.702	-2.00	0.5571
Q8WUY3	Protein prune homolog 2	-0.27		-1.12		-0.57	1.49	-0.746		-2.312		-1.99	0.5086
Q9UGM5	Fetuin-B	-0.59	-1.26	-0.33	-0.31	-0.50	1.41	-1.671	-0.902	-0.693	-0.458	-1.94	0.5124
P02649	Apolipoprotein E	-0.32	0.245	-0.76		-0.46	1.37	-1.028	0.1981	-1.895		-1.90	0.4719
P00915	Carbonic anhydrase 1	-0.88	0.151	-0.03	0.097	-0.42	1.34	-2.762	0.1184	-0.082	0.1702	-1.90	0.4431
P02675	Fibrinogen beta chain	-0.69	0.599	-0.32	0.193	-0.39	1.31	-2.297	0.4696	-0.913	0.3732	-1.89	0.4162
POCL4	Complement C4-A	-0.26	-0.77	-0.34	-0.56	-0.35	1.28	-0.911	-0.676	-1.11	-1.216	-1.89	0.3901
Q96PD5	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	-0.35	-1.12	-0.15	-0.96	-0.37	1.30	-1.085	-0.783	-0.383	-1.398	-1.61	0.57
Q9P2P1	Protein NYNRIN 3			-0.32	-1.14	-0.60	1.51			-0.684	-1.758	-1.58	0.573
Q07075	Glutamyl aminopeptidase	-0.51		-0.39	-0.02	-0.40	1.32	-1.443		-0.836	-0.034	-1.55	0.5805
P49908	Selenoprotein P	0.347		0.619		0.44	1.36	0.9596		1.2804		1.54	0.5425
P01857	Ig gamma-1 chain C region	-0.03	3.985	0.161	0.872	0.34	1.26	-0.091	3.3436	0.4381	1.7544	1.56	0.5406
Q96AE4	Far upstream element-binding protein 1		0.693	0.735		0.73	1.66		0.4868	1.5203		1.60	0.5506
P53007	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	0.4	-0.8	0.757	0.111	0.42	1.34	1.1073	-0.563	1.566	0.1626	1.61	0.5618
P01009	Alpha-1-antitrypsin		2.759	0.03	0.811	0.56	1.48		2.1611	0.0622	1.5662	1.65	0.5465
P01023	Alpha-2-macroglobulin		1.48	0.223	0.782	0.56	1.48		1.2575	0.4808	1.6027	1.75	0.5047
P02787	Serotransferrin	-0.15	2.308	0.307	1.408	0.43	1.34	-0.401	1.906	0.873	2.8633	1.94	0.4338
P02748	Complement component C9	0.333	1.797	0.723	-0.07	0.43	1.35	1.0755	1.4075	1.8309	-0.132	1.97	0.438
POCG05	Ig lambda-2 chain C regions	0.158	3.713	0.477	1.227	0.53	1.44	0.4386	2.6069	0.9866	1.7904	2.02	0.4235
P02741	C-reactive protein	0.317	1.245	0.842	-0.23	0.45	1.37	0.984	1.03	2.2931	-0.413	2.06	0.4723
P02735	Serum amyloid A protein		1.987	0.794	0.28	0.75	1.69		1.5448	2.0095	0.4083	2.28	0.3559
B9A064	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5		2.956		0.971	1.27	2.40		2.3996		1.8918	2.68	0.3071
Q6PJG0	Putative uncharacterized protein		4.245		1.082	1.68	3.20		2.9803		1.5782	2.72	0.4466

Figura 9: Proteínas que aumentan (celdas verdes) o disminuyen (celdas rojas) en pacientes con AAA en seguimiento, con respecto a controles. Proteínas cuantificadas en 2 o más experimentos. $Zq' \geq [1,5]$. Xq , Zq : Parámetros estadísticos del programa de cuantificación proteómica. FDRq: False Discovery Rate.

Para determinar el patrón global de proteínas que mostraban cambios estadísticamente significativos en pacientes con AAA en rango quirúrgico versus AAA en seguimiento y controles, se analizaron, como un conjunto, los resultados obtenidos de los seis experimentos, utilizando un potente modelo estadístico que controlaba la variabilidad de las cuantificaciones entre diferentes muestras, independientemente de otras muestras de variabilidad^{137; 138}. Tras la integración, se obtuvieron los datos cuantitativos de un total de 138 proteínas. Utilizando como umbral el 5% de FDRq, se observó que 29 proteínas

estaban alteradas, en cuanto a su cantidad, en la comparativa entre controles y pacientes con AAA en seguimiento (*Figura 9*).

Uniprot	Protein Name	Corrected log2-ratio (Xq _e -X _e)					(Xq')	Fold change	Standardized normal value (Zq _e)					(Zq')	FDRq'
		-2 0 2							-4 0 4						
		A	B	D	E	All			A	B	D	E	All		
P02741	C-reactive protein	-3.07	-2.36	-3.91	-2.53	-3.21	9.27	-6.33	-1.65	-5.95	-2.38	-9.07	2.4459E-17		
P02735	Serum amyloid A protein		-2.08	-3.67	-1.2	-2.97	7.81		-1.38	-5.62	-1.02	-5.56	1.8398E-06		
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin	-0.59	-2.97	-1.56	-1.5	-1.12	2.17	-1.32	-2.13	-2.73	-1.53	-3.49	0.01		
D6RAK8	Uncharacterized protein		-1.78	-2.25		-2.17	4.51		-1.10	-3.02		-3.21	0.03		
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	-0.66	-1.74	-1.58	-0.32	-0.97	1.96	-1.41	-1.20	-2.60	-0.31	-2.86	0.08		
E9PFZ2	Uncharacterized protein	-1.63			-0.05	-1.36	2.57	-3.02			-0.04	-2.77	0.09		
Q6ZQQ6	WD repeat-containing protein 87	-1.03			-2.75	-1.32	2.50	-1.90			-2.32	-2.70	0.10		
P18428	Lipopolysaccharide-binding protein	-0.89		-1.08	-0.46	-0.90	1.87	-1.80		-1.68	-0.43	-2.45	0.17		
P02748	Complement component C9	-0.8	0.41	-0.7	-1.2	-0.75	1.68	-1.71	0.27	-1.07	-1.15	-2.16	0.34		
P04114	Apolipoprotein B-100	-0.41	-1.18	-0.95	-0.73	-0.66	1.58	-0.93	-0.85	-1.70	-0.75	-2.09	0.36		
P02649	Apolipoprotein E	-0.47	-0.37	-1.2		-0.70	1.62	-1.00	-0.25	-1.83		-1.88	0.54		
P02671	Fibrinogen alpha chain	-0.7	-0.05	-0.56	-0.47	-0.60	1.51	-1.57	-0.03	-0.97	-0.48	-1.85	0.53		
P0C0L4	Complement C4-A	-0.43	-1.07	-0.56	-1.05	-0.57	1.49	-0.98	-0.77	-0.99	-1.09	-1.81	0.54		
P01031	Complement C5	-0.43	-1.05	-0.64	-0.75	-0.56	1.48	-0.95	-0.74	-1.09	-0.75	-1.72	0.61		
Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	-0.28	-1.37	-0.71	-0.88	-0.54	1.45	-0.62	-0.98	-1.24	-0.90	-1.68	0.63		
A2BHY4	Complement component C4B (Chido blood group)	-0.59	-0.89	-0.52	-0.91	-0.63	1.54	-1.09	-0.59	-0.71	-0.79	-1.60	0.69		
P43652	Afamin	0.739	-0.61	0.767	-0.52	0.54	1.45	1.63	-0.43	1.30	-0.52	1.64	0.44		
P69905	Hemoglobin subunit alpha		1.905		1.424	1.59	3.01		1.17		1.20	1.67	0.44		
Q96AE4	Far upstream element-binding protein 1		1.101	1.217		1.20	2.29		0.68	1.63		1.77	0.41		
P51884	Lumican	0.707	0.434	0.648	0.152	0.61	1.53	1.53	0.30	1.07	0.15	1.83	0.38		
P01042	Kininogen-1	0.875	-0.72	0.703	-0.26	0.61	1.53	1.92	-0.51	1.20	-0.26	1.86	0.37		
P04196	Histidine-rich glycoprotein	0.529	0.212	1.063	0.039	0.63	1.54	1.15	0.15	1.79	0.04	1.88	0.37		
Q93074	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12		2.937		1.243	1.83	3.56		1.81		1.05	1.92	0.42		
Q9Y3D8	Adenylate kinase isoenzyme 6	0.925		1.314	-0.82	0.84	1.79	1.79		1.76	-0.69	2.10	0.30		
P06396	Gelsolin	0.697	0.156	1.205	-0.44	0.70	1.63	1.52	0.11	1.98	-0.42	2.10	0.32		
P06727	Apolipoprotein A-IV	0.505	0.788	1.153	0.178	0.69	1.61	1.13	0.57	2.02	0.18	2.15	0.31		
P00738	Haptoglobin		2.864		1.669	2.07	4.21		1.77		1.44	2.20	0.30		
B9A064	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5		2.675		1.435	1.84	3.59		1.84		1.41	2.21	0.33		
P01834	Ig kappa chain C region		4.919		0.615	2.08	4.24		3.08		0.53	2.24	0.35		
P01871	Ig mu chain C region		2.495		1.605	1.90	3.73		1.71		1.57	2.28	0.36		
P01009	Alpha-1-antitrypsin		3.74	0.351	1.815	1.28	2.43		2.56	0.47	1.78	2.31	0.40		
P02647	Apolipoprotein A-I	0.049	3.011	1.321	1.712	0.78	1.72	0.11	2.16	2.24	1.74	2.40	0.48		
Q6PJG0	Putative uncharacterized protein		2.97		3.799	3.51	11.39		1.83		3.20	3.68	0.00979093		
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	1.09	-0	2.935	-0.95	1.38	2.61	2.27	0.00	4.50	-0.82	3.90	0.0067555		
P53007	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	1.29	1.516	3.812	-0.1	1.86	3.64	2.39	0.93	5.10	-0.08	4.69	0.00055684		

Figura 10: Proteínas que aumentan (celdas verdes) o disminuyen (celdas rojas) en pacientes con AAA en rango quirúrgico, con respecto a controles. Proteínas cuantificadas en 2 o más experimentos. Zq' $\geq [1,5]$. Xq, Zq: Parámetros estadísticos del programa de cuantificación proteómica. FDRq: False Discovery Rate.

El análisis comparativo entre controles y pacientes con AAA en rango quirúrgico demostró una expresión diferencial de 35 proteínas, de las cuales 4 estuvieron aumentadas y 3 reducidas de forma estadísticamente significativa (*Figura 10*). En ambas comparativas, el número de proteínas aumentadas en pacientes respecto a controles fue de 16. Finalmente, se compararon las proteínas expresadas en pacientes con AAA en rango quirúrgico vs AAA en seguimiento, observándose una expresión incrementada de 30 proteínas y disminuida de 18 proteínas en el primer grupo respecto al segundo. De entre ellas, se obtuvo la significación estadística en 9 y 6 del total de proteínas aumentadas y reducidas, respectivamente (*Figura 11*).

		Corrected log2-ratio						Standardized normal value									
		(Xq-X)						(Xq')	Fold change	(Zq)						(Zq')	FDRq'
Uniprot	Protein Name	A	B	C	D	E	F	All		A	B	C	D	E	F	All	
P02735	Serum amyloid A protein		-3.92		-4.49	-1.4		-3.53	11.55		-8.24		-8.64	-2.18		-11.51	2E-28
P02741	C-reactive protein		-3.46	-0.52		-2.21	-1.93	-2.29	4.88		-7.87	-0.73		-3.95	-4.95	-9.44	3E-19
P0CG05	Ig lambda-2 chain C regions	-2.18	0.09	1.376	-1.09	3.41	-4.36	-1.51	2.84	-6.2	0.17	1.91	-1.84	5.36	-11.2	-7.61	1E-12
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin	-1.14	-1.86	-1.04	-1.81	-1.24	-0.2	-1.08	2.11	-4.31	-4.5	-1.62	-3.92	-2.48	-0.64	-7.01	7E-11
P02748	Complement component C9	-1.25	-1.26	0.366	-1.46	-1.04	-0.56	-0.96	1.95	-4.31	-2.67	0.54	-2.81	-1.91	-1.74	-5.74	2E-07
P01859	Ig gamma-2 chain C region	-1.52			-0.3		-1.56	-1.30	2.46	-4.34			-0.57		-4.02	-5.07	5E-07
D6RAK8	Uncharacterized protein		-2.08		-2.33			-2.19	4.56		-3.85		-3.92			-5.50	6E-07
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	-0.7	-1.66	-0.25	-1.3	-0.55	-0.85	-0.90	1.87	-2.43	-3.69	-0.35	-2.61	-1.01	-2.45	-5.33	1E-06
E9PFZ2	Uncharacterized protein	-1.63				-0.65		-1.40	2.64	-4.64				-1.01		-4.56	6E-05
P01880	Ig delta chain C region			-1.24			-0.89	-0.97	1.96			-1.71			-2.29	-2.83	0.0522
P18428	Lipopolysaccharide-binding protein	-0.77			-1.19	-0.55	0.244	-0.53	1.44	-2.5			-2.34	-0.97	0.63	-2.61	0.0926
Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	-0.19	-0.85	-0.46	-0.74	-0.5	-0.22	-0.40	1.32	-0.71	-2.04	-0.72	-1.6	-0.99	-0.72	-2.56	0.0995
P05546	Heparin cofactor 2	-0.42	-0.22	-0.64	-0.38	-0.31	-0.43	-0.39	1.31	-1.53	-0.5	-0.99	-0.8	-0.59	-1.31	-2.43	0.1288
P04114	Apolipoprotein B-100	-0.36	-0.25	-0.15	-0.36	-0.38	-0.43	-0.35	1.28	-1.4	-0.61	-0.24	-0.8	-0.76	-1.42	-2.33	0.1587
P02760	Protein AMBP	-0.69	-0.26	-0.8	-0.04	-0.55	-0.05	-0.40	1.32	-2.34	-0.55	-1.12	-0.08	-1.02	-0.14	-2.29	0.163
Q6PJG0	Putative uncharacterized protein		-1.13					-1.13	2.18		-2.09					-2.10	0.2517
Q8NFY4	Semaphorin-6D		-1.08					-1.08	2.11		-2					-2.01	0.2924
P01876	Ig alpha-1 chain C region	-1.54	0.016	2.525	0.106	0.807	-0.89	-0.37	1.29	-4.39	0.04	3.56	0.18	1.51	-2.36	-1.98	0.2786
Q6U2E9	Q6U2E9_HUMAN C4B1		0.237	-1.83	0.151		-0.72	-0.48	1.40		0.44	-2.54	0.25		-1.92	-1.89	0.3245
P01031	Complement C5	-0.27	-0.28	-0.16	-0.39	-0.66	-0.17	-0.29	1.22	-1.01	-0.66	-0.25	-0.83	-1.3	-0.55	-1.85	0.3356
Q86T82	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 37				-1.07			-1.07	2.10				-1.81			-1.81	0.3535
P11226	Mannose-binding protein C	-0.62						-0.62	1.54	-1.78						-1.78	0.3607
P00751	Complement factor B	-0.3	0.221	-0.6	0.035	-0.88	-0.34	-0.27	1.21	-1.13	0.53	-0.94	0.08	-1.75	-1.1	-1.77	0.3541
P02743	Serum amyloid P-component	-0.33	-0.2	-0.41	-0.05	-0.36	-0.32	-0.28	1.22	-1.18	-0.44	-0.62	-0.11	-0.69	-0.99	-1.76	0.3471
A28HY4	Complement component C4B (Chilido blood group)	-0.33	-0.22	-0.29	-0.03	-0.68	-0.33	-0.31	1.24	-0.95	-0.46	-0.43	-0.05	-1.08	-0.96	-1.66	0.4071
Q9Y5V7	Lymphatic vessel endothelial hyaluronan acid receptor 1	-0.39				-0.89	-0.50	-0.50	1.42	-1.1				-1.38		-1.64	0.4126
Q8NFI6	Amphiphysin I variant CT4 (Fragment)					-1.04		-1.04	2.06					-1.63		-1.64	0.4004
P00748	Coagulation factor XII	-0.56					-0.56	1.47		-1.58						-1.59	0.4254
Q13595	Transformer-2 protein homolog alpha		-0.85				-0.85	-0.85	1.80		-1.57					-1.58	0.4219
Q6ZQQ6	WD repeat-containing protein 87	-0.37				-0.83	-0.47	-0.47	1.39	-1.05				-1.29		-1.55	0.4307
P02654	Apolipoprotein C-I	0.346	0.574		0.437			0.42	1.34	0.98	1.06		0.74			1.59	0.4558
P04196	Histidine-rich glycoprotein	0.15	0.561	-0.55	1.319	0.65	-0.14	0.27	1.20	0.54	1.28	-0.84	2.72	1.25	-0.45	1.65	0.4342
P00915	Carbonic anhydrase 1	0.547	-0.3	-0.02	-0.18	-0.36	0.82	0.30	1.23	1.84	-0.64	-0.03	-0.34	-0.63	2.39	1.74	0.3794
P29622	Kallistatin	0.323	0.533	-0.26	0.787	0.176	0.301	0.35	1.27	1.17	1.13	-0.39	1.62	0.34	0.92	2.12	0.1719
P43652	Afamin	0.263	0.593	-0.26	0.633	0.033	0.412	0.34	1.26	0.96	1.38	-0.38	1.35	0.07	1.3	2.12	0.1781
P01042	Kininogen-1	0.505	0.87	-0.22	0.632	-0.07	0.189	0.39	1.31	1.86	2.01	-0.34	1.34	-0.13	0.6	2.46	0.0915
P05452	Tetranectin	0.641	1.045			0.222		0.67	1.59	1.82	1.94			0.36		2.50	0.0917
Q9UGM5	Fetuin-B	0.193	1.304		1.262	-0.93	0.765	0.52	1.44	0.58	2.48		2.12	-1.45	1.97	2.60	0.0755
P08185	Corticosteroid-binding globulin	0.492	1.305		1.013	0.041	0.048	0.50	1.42	1.63	2.42		1.78	0.07	0.12	2.61	0.0786
Q9Y3D8	Adenylate kinase isoenzyme 6	0.742			1.017	0.526		0.76	1.69	2.23			1.71	0.83		2.88	0.0368
P51884	Lumican	0.41	0.868	-0.03	0.67	0.68	0.301	0.47	1.39	1.46	1.93	-0.05	1.38	1.31	0.92	2.89	0.0394
P06396	Gelsolin	0.527	0.976	0.107	1.176	-0.38	0.304	0.50	1.41	1.9	2.22	0.16	2.34	-0.7	0.92	3.01	0.0293
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	0.699	1.752	-0.54	2.412	-0.3	0.428	0.81	1.75	2.34	3.75	-0.8	4.64	-0.48	1.25	4.64	7E-05
Q93074	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12		2.11	1.811		0.944		1.67	3.18		3.91	2.51		1.49		4.69	7E-05
P53007	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	0.823	2.466	-0.25	3.018	-0.12	0.426	1.01	2.02	2.34	4.57	-0.35	5.08	-0.19	1.1	5.12	9E-06
P06727	Apolipoprotein A-IV	1.077	2.156	-0.31	1.967	0.205	0.235	0.95	1.93	4.06	5.2	-0.49	4.25	0.42	0.77	6.13	4E-08
P02652	Apolipoprotein A-II	2.178	2.291	0.732	-0.19	1.009	1.184	1.51	2.84	7.07	4.86	1.02	-0.32	1.88	3.42	8.48	0
P02647	Apolipoprotein A-I	1.84	3.265	0.844	3.224	1.486	0.617	1.77	3.42	6.81	7.76	1.32	6.75	2.96	2.02	11.35	0

Figura 11: Proteínas que aumentan (celdas verdes) o disminuyen (celdas rojas) en pacientes con AAA en rango quirúrgico, con respecto a pacientes con AAA en seguimiento. Proteínas cuantificadas en 2 o más experimentos. $Zq' \geq [1,5]$. Xq , Zq : Parámetros estadísticos del programa de cuantificación proteómica. $FDRq$: False Discovery Rate.

Entre las proteínas incrementadas en pacientes con AAA en seguimiento respecto a controles, no se observaron variaciones significativas, posiblemente porque el daño local no se refleja de forma tan acusada como para ver cambios a nivel sistémico cuando se compara un pequeño número de muestras. En cambio, en la comparativa entre pacientes con AAA en rango quirúrgico frente a controles, ya se demuestra un aumento de varias proteínas implicadas en la respuesta inmuno-inflamatoria como los componentes C4, 5 y 9 del complemento, así como una elevación de PCR y proteína amiloide sérica A. Finalmente, en la comparativa entre los dos estadios clínicos de AAA, se evidenció de nuevo una elevación de PCR, componente C9 del complemento, proteína amiloide sérica A y α -1-antiquimiotripsina en el grupo de AAA en rango

quirúrgico. Respecto a las proteínas disminuidas, se observó una disminución significativa de las apolipoproteínas 4, 2 y 1 (ApoA4, ApoA2 y ApoA1), relacionadas con el metabolismo lipídico, en pacientes con AAA en rango quirúrgico frente a pacientes con AAA en seguimiento. Asimismo, se observó una disminución de ApoA1 en los pacientes con AAA en rango quirúrgico frente a controles.

Es importante señalar que la columna MARS14 sólo consiguió eliminar el 20% de ApoA1. Sin embargo, decidimos validar ApoA1 porque mostraba el descenso más significativo en sus niveles de expresión, y este descenso se detectaba de forma contundente en todos los pacientes con AAA en rango quirúrgico frente a pacientes con AAA en seguimiento, sugiriendo que la disminución en la expresión de esta proteína podría utilizarse para monitorizar la evolución del AAA. Además, como un potencial biomarcador de progresión aneurismática, ApoA1 podría ser medida por métodos convencionales turbimétricos en cohortes grandes de pacientes, de forma sencilla y no excesivamente costosa, lo que favorecería su potencial aplicación clínica. Más aún, ApoA1 podría ser unida mecanísticamente a la progresión del AAA, y ser una diana interesante para estrategias terapéuticas.

4.1.2 Validación de ApoA1 en pacientes con AAA

Para determinar si los bajos niveles de ApoA1 podrían ser un biomarcador de evolución del AAA así como para afianzar su papel como posible biomarcador diagnóstico, se midieron las concentraciones circulantes de ApoA1 en un gran número de pacientes con AAA en rango quirúrgico, AAA en seguimiento y controles sanos (*Tabla 1*).

De acuerdo con los resultados obtenidos por la proteómica cuantitativa, los niveles circulantes de ApoA1 aparecían significativamente reducidos en el plasma de pacientes con AAA en rango quirúrgico (n=26) respecto a pacientes con AAA en seguimiento (n=90) y controles (n=112)[133±5 vs 150±3 vs 166±28,1 mg/dl, p <0,001] (*Tabla 2 y Figura 12*).

Tabla 2: Concentraciones en suero (media \pm DE o mediana y rango intercuartil) de los parámetros bioquímicos y lipídicos en el grupo control y en los pacientes con AAA en seguimiento y en rango quirúrgico.

CONCENTRACIONES PARÁMETROS BIOQUÍMICOS			
	Controles (n = 112)	AAA 30-50mm (n = 90)	AAA >50mm (n = 26)
	Concentraciones en suero	Concentraciones en suero	Concentraciones en suero
Colesterol (mg/dl)	211 \pm 35,4	191 (167-220) *	186 (149-242) *
Triglicéridos (mg/dl)	105 \pm 44,7	115 (89-159) *	149 (102-184) *
LDL-colesterol (mg/dl)	132 \pm 31,7	117 (91-151)	107 (85-161)
HDL-colesterol (mg/dl)	58,6 \pm 15,7	49 (41-57) *	41 (35-49) **
ApoA1 (mg/dl)	166 \pm 28,1	150 (129-168) *	135 (113-144) **
ApoB (mg/dl)	98 \pm 20,3	93 (76-115)	92 (74-126)
ApoB/ApoA1	0,6 \pm 0,15	0,66 \pm 0,20 *	0,75 \pm 0,24 *
LDL/ApoB	1,33 \pm 0,13	1,29 \pm 0,18 *	1,22 \pm 0,22 *

* $p < 0,001$ respecto al grupo control, ** $p < 0,001$ respecto al grupo de AAA con diámetro 30-50 mm.

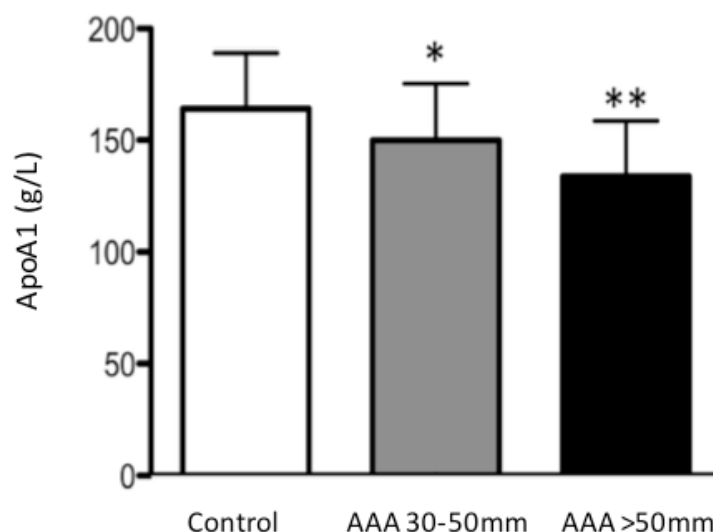


Figura 12: Concentraciones de ApoA1 en controles, pacientes con AAA en seguimiento y pacientes con AAA en rango quirúrgico. * $p < 0,001$ respecto al grupo control, ** $p < 0,001$ respecto al grupo de AAA 30-50 mm.

Más aún, los niveles de ApoA1 mostraron una correlación negativa con el diámetro aórtico y el volumen del trombo ($r = -0,4$ y $r = -0,3$, respectivamente, $p < 0,01$ para ambos) (Figura 13).

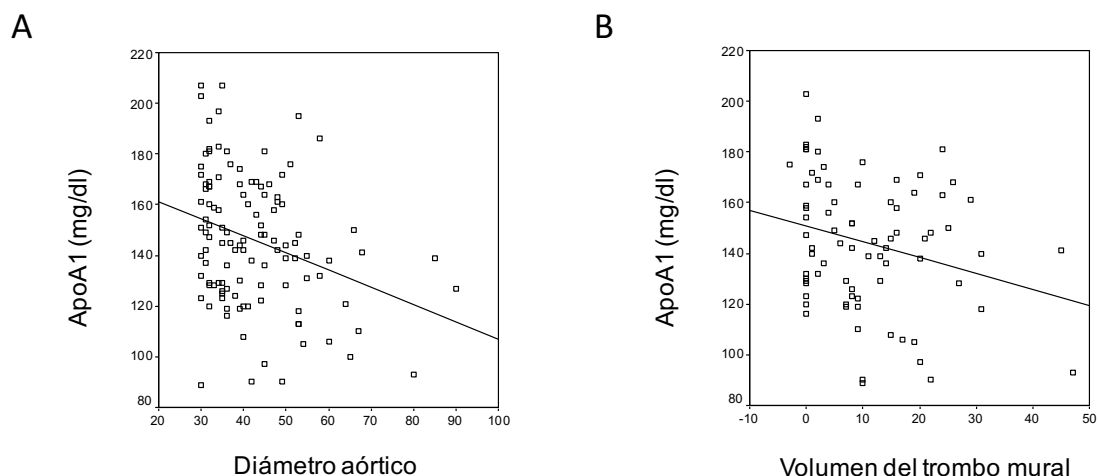


Figura 13: Correlación negativa de la concentración de ApoA1 con el diámetro aórtico (A) y con el volumen del trombo (B).

Este resultado se mantuvo significativo tras ajustar por factores de riesgo tradicionales en el análisis multivariante (Tablas 3 y 4).

Tabla 3: Análisis multivariante de ApoA1 con el diámetro aórtico.

DIÁMETRO AÓRTICO				
	B	E. estándar	t	Valor de p
(Constante)	50,733	15,01	3,38	0,001
Sexo	-10,994	7,305	-1,5	0,135
Edad	0,417	0,145	2,88	0,005
Dislipemia	1,113	3,194	0,349	0,728
Tabaquismo activo	2,2	2,31	0,953	0,343
Hipertensión	1,866	2,47	0,756	0,452
Enfermedad coronaria	-5,043	2,669	-1,89	0,062
Tratamiento estatinas	-1,723	3,04	-0,567	0,572
ApoA1	-0,168	0,044	-3,829	<0,001

Variable dependiente: diámetro aórtico. B: Coeficiente de correlación con el diámetro aórtico.

Tabla 4: Análisis multivariante de ApoA1 con el volumen del trombo del AAA.

VOLUMEN TROMBO AÓRTICO				
	B	E. estándar	t	Valor de p
(Constante)	26,147	16,453	1,589	0,116
Sexo	-4,626	6,788	-0,681	0,498
Edad	0,148	0,159	0,929	0,356
Dislipemia	2,704	3,542	0,763	0,448
Tabaquismo activo	1,746	2,5	0,699	0,487
Hipertensión	-6,397	3,232	-1,979	0,052
Enfermedad coronaria	-4,259	2,762	-1,542	0,127
Tratamiento estatinas	1,012	3,222	0,314	0,754
ApoA1	-0,148	0,046	-3,229	0,002

Variable dependiente: trombo aórtico. B: Coeficiente de correlación con el volumen del trombo.

Además, y tal como se esperaba, los niveles de ApoA1 se correlacionaron fuertemente con la concentración de HDLc ($r=0,9$, $p < 0,001$) (Figura 14). Se realizó también una curva ROC (Figura 15), en la que se demuestra como ApoA1 presenta una sensibilidad y especificidad significativas en cuanto a la presencia de AAA con un área bajo la curva de 0,69 [0,62-0,76], $p < 0,001$, 95% CI.

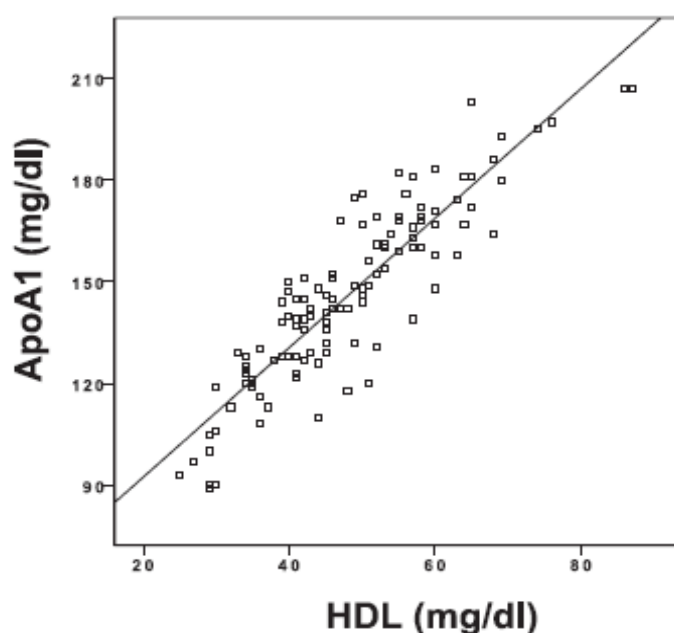


Figura 14: Correlación positiva de la concentración de ApoA1 con la concentración de HDLc.

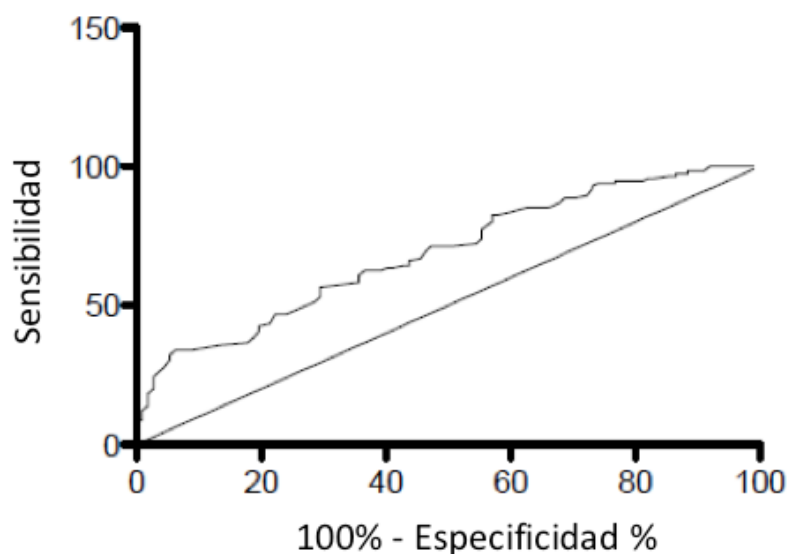


Figura 15: Curva ROC de ApoA1.

4.1.3 ApoA1 en tejido de AAA

Dado que una de las características de la evolución del AAA es la formación y renovación del trombo y, puesto que se había observado una asociación negativa con su volumen, se analizó ApoA1 en el tejido aneurismático. Se encontró una elevada tinción extracelular de ApoA1 en el trombo del AAA y también, aunque en menor grado, en la pared, pero no hubo tinción de la proteína en las muestras de pared sana (*Figura 16*).

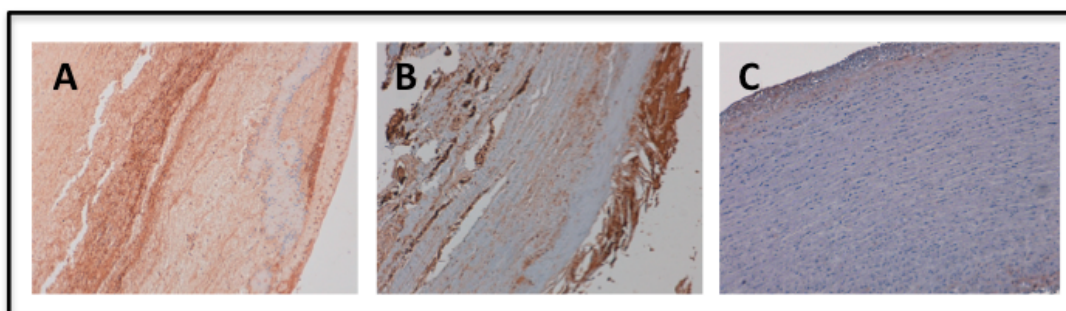


Figura 16: ApoA1 en tejido aneurismático. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de ApoA1: A.- En el trombo. 10X. B.- En la media patológica del AAA humano. 10X. C.- En la pared aórtica humana sana. 10X.

Posteriormente, se planteó el análisis inmunohistoquímico de malondialdehído (MDA), como marcador de oxidación lipídica. Se observó un aumento en la tinción de MDA a

nivel del trombo y, en menor medida, en la pared patológica, mientras que en la pared sana no hubo tinción (*Figura 17*).

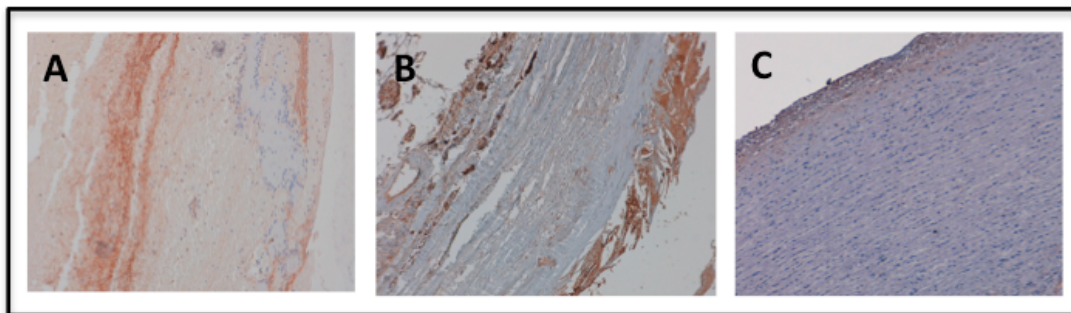


Figura 17: MDA en tejido aneurismático. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de MDA: A.- En el trombo. 10X. B.- En la media patológica del AAA humano. 10X. C.- En la pared aórtica humana sana. 10X.

4.1.4 ApoA1/HDLc se asocia negativamente con el crecimiento de AAA y la necesidad de intervención quirúrgica posterior

El papel de la concentración de HDLc, respecto a su asociación con la progresión del AAA, fue evaluado en un estudio de cohorte prospectivo de base poblacional de AAA, detectado mediante cribado poblacional (Estudio Viborg). El tiempo medio de seguimiento en el Estudio Viborg fue de 8,1 años mientras que la tasa de crecimiento medio aneurismático fue de 2,92 mm/año. Treinta y seis de esos pacientes fueron derivados para intervención quirúrgica.

En la *Tabla 5* se muestran las características clínicas y demográficas, así como las asociaciones potenciales de las mismas con la tasa de crecimiento aneurismático o con el HDLc, identificando posibles factores de confusión. El tabaquismo y el diámetro inicial del AAA se asociaron de forma positiva con la tasa de crecimiento aneurismático mientras que el HDLc tendió a una asociación negativa con la misma en el análisis univariante ($r=-0,18$, $p=0,07$) (*Figura 18*). Sin embargo, en el análisis de regresión lineal múltiple, la concentración de HDLc se convirtió en un fuerte predictor independiente de crecimiento aneurismático ($p=0,008$).

Tabla 5: Análisis univariante de ApoA1/HDLc con el crecimiento, así como la asociación de otros posibles factores de confusión tanto con el crecimiento como con la HDL.

VARIABLES CLÍNICAS			
Variables categóricas	N(%)	Media crecimiento AAA (DE)	Media de HDL (DE)
Tabaquismo activo	Sí = 66 (54)	2,02 (1,59)	1,19 (0,28)
	No = 56 (46)	3,51 (3,12) *	1,24 (0,39)
IAM previo +	Sí = 17 (14)	2,95 (2,83)	1,22 (0,36)
	No = 105 (86)	2,85 (2,18)	1,15 (0,25)
Hipertensión +	Sí = 29 (24)	2,92 (2,79)	1,20 (0,31)
	No = 93 (76)	2,97 (2,58)	1,26 (0,44)
Enfermedad aterosclerótica +	Sí = 36 (30)	3,16 (2,06)	1,20 (0,32)
	No = 86 (70)	2,48 (1,83)	1,23 (0,41)
Tratamiento con glucocorticoides	Sí = 10 (8)	2,99 (2,80)	1,19 (0,34)
	No = 102 (92)	2,43 (1,97)	1,36 (0,39)
Tratamiento con betabloqueantes	Sí = 16 (13)	3,00 (2,74)	1,23 (0,35)
	No = 104 (87)	2,38 (2,70)	1,04 (0,21) *
Tratamiento con AAAs a dosis bajas	Sí = 52 (43)	3,25 (3,26)	1,23 (0,39)
	No = 70 (57)	2,56 (1,85)	1,19 (0,31)
Tratamiento con IEACs	Sí = 13 (11)	2,93 (2,78)	1,22 (0,33)
	No = 56 (89)	2,87 (2,39)	1,19 (0,48)
Variables continuas		Crecimiento AAA (r Pearson)	HDL (r Pearson)
Edad (años)		0,17 **	0
Índice de masa corporal (kg/m ²)		-0,002	0,1
Tensión arterial sistólica (mm Hg)		0,13	-0,11
Tensión arterial diastólica (mm Hg)		0,08	-0,15
Índice tobillo-brazo		0,15	0,03
Diámetro máximo inicial AAA (mm)		0,44 *	0,07
Tasa de crecimiento aneurismático			0,18

IAM: Infarto agudo de miocardio. IEACs: Inhibidores del enzima convertidor de angiotensina. +: Causa de ingreso hospitalario previo. DE: Desviación Estándar. * $p < 0,05$. ** $p = 0,09$.

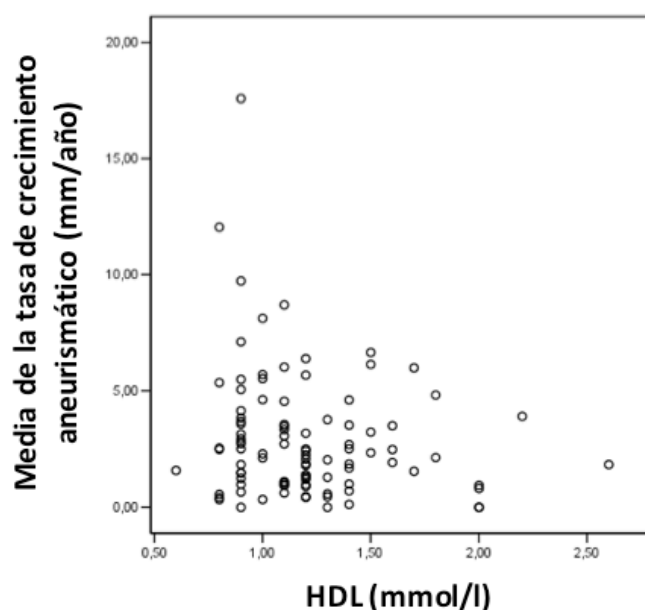


Figura 18: Asociación del HDLc con la tasa de crecimiento aneurismático.

El diámetro inicial del AAA y el tabaquismo permanecieron asociados de forma significativa con la tasa de crecimiento aneurismático tras el análisis multivariante (Tabla 6). En los análisis univariantes, el HDLc no estaba asociado con la necesidad de reparación quirúrgica [*Hazard Ratio* crudo (HR): 0,50 (intervalo de confianza del 95% (CI): 0,16, 1,53), $p=0,22$]. Sin embargo, tras ajustar por los ya mencionados factores de confusión, la concentración de HDLc pasó a asociarse negativamente de forma significativa con la necesidad de reparación quirúrgica [HR ajustado: 0,18 (CI 95%: 0,04, 0,74), $p=0,018$].

Tabla 6: Análisis de regresión lineal múltiple de la HDL como predictora de la tasa de crecimiento aneurismático en pacientes con AAA en seguimiento (Estudio Viborg).

CRECIMIENTO ANEURISMÁTICO					
	B	E. estándar	Valor de p	IC 95% (límite inferior)	IC 95% (límite superior)
(Constante)	-5,675	6,168	0,36	-17,927	6,577
HDL	-1,978	0,724	0,008	-3,416	-0,54
Diámetro inicial máximo del AAA (mm)	0,233	0,046	<0,001	0,141	0,325
Tabaquismo activo	1,281	0,492	0,011	0,303	2,259
Tratamiento betabloqueantes	-0,158	0,714	0,825	-1,577	1,26
Edad	0,031	0,088	0,724	-0,144	0,206

Variable dependiente: tasa de crecimiento aneurismático. B: Coeficiente de correlación con el crecimiento aneurismático. IC: Intervalo de confianza.

Las curvas de supervivencia de tiempo libre de reparación quirúrgica para las concentraciones de HDLc por encima y por debajo de la media, significativamente distintas, se muestran en la *Figura 19* [HR ajustado: 0,39 (CI 95%: 0,15, 0,96), $p=0,041$].

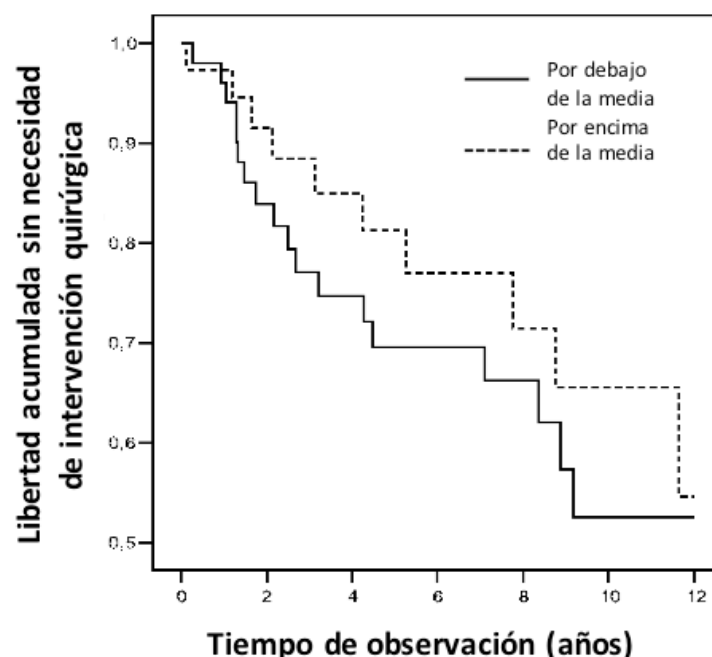


Figura 19: Asociación del HDLc con la necesidad de reparación quirúrgica.

4.1.5 El HDLc se asocia de forma negativa con la incidencia de AAA, independientemente de la enfermedad aterosclerótica

En este momento, se pretendió dar un paso más para evaluar si los bajos niveles de ApoA1/HDLc en AAA podrían estar asociados con mecanismos clave implicados en la evolución del AAA y no asociados de forma global con la aterosclerosis. Para ello, se estudió la concentración de HDLc en un estudio epidemiológico (Registro Vascular Danés), analizando los pacientes ateroscleróticos vs los pacientes con AAA en rango quirúrgico. Las características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en dicho registro se reflejan en la *Tabla 7*.

Tabla 7: Características clínicas y demográficas del Registro Vascular Danés.

VARIABLES CLÍNICAS			
Variables dicotómicas	Enfermedad oclusiva aortoiliaca n (proporción)	AAA n (proporción)	Odds ratio (IC 95%)
Varones	9,344 (0,53)	5,332 (0,83)	4,39 (4,09-4,72) *
Tabaquismo activo	10,009 (0,58)	3,039 (0,52)	0,75 (0,71-0,80) *
Diabetes Mellitus	2,174 (0,13)	444 (0,07)	0,56 (0,50-0,62) *
Enfermedad cardíaca isquémica	4,141 (0,24)	2,134 (0,36)	1,76 (1,65-1,87) *
Hipertensión arterial	7,459 (0,43)	3,065 (0,51)	1,38 (1,30-1,47) *
Variables continuas	Enfermedad oclusiva aortoiliaca Media (DE)	AAA Media (DE)	Valor de p
Edad	69,4 (11,6)	70,2 (8,3)	<0,001
Índice de masa corporal (kg/m ²)	27,8 (8,6)	26,3 (4,2)	<0,001
Aclaramiento de creatinina (ml/min)	81,7 (8,7)	81,0 (7,6)	0,661

DE: Desviación estándar. IC: Intervalo de confianza. * $p < 0,05$.

En líneas generales, se detectaron diferencias relacionadas con distintas variables, especialmente respecto al género. Sin embargo, la concentración media de HDLc en los pacientes con AAA fue casi la mitad de la concentración observada en el grupo con enfermedad oclusiva aortoiliaca ($0,89 \pm 2,99$ vs $1,59 \pm 5,74$ mmol/l, $p < 0,001$).

Esta diferencia se mantuvo estadísticamente significativa tras ajustar por género, edad, tabaquismo, diabetes, hipertensión y enfermedad isquémica cardíaca (Tabla 8).

Tabla 8: Análisis de regresión lineal múltiple del AAA como predictor independiente de los niveles de HDLc ajustando por los factores de confusión identificados.

NIVELES DE HDLc					
	B	Error estándar	Beta	t	Valor de p
(Constante)	1,324	0,227		5,836	0
AAA	-0,268	0,13	-0,025	2,067	0,039
Edad	0,003	0,003	0,016	1,258	0,208
Género	-0,225	0,118	-0,023	1,903	0,057
Índice de masa corporal	-0,001	0,003	-0,005	-0,391	0,696
Tabaquismo	0,106	0,111	0,011	0,955	0,34
Diabetes Mellitus	0,063	0,164	0,005	0,387	0,698
Hipertensión	-0,568	0,115	-0,06	4,961	<0,001
Enfermedad coronaria	0,103	0,125	0,01	0,821	0,412

Variable dependiente: Concentración media de HDLc. B: Coeficiente de correlación con los niveles de HDLc.

4.1.6 Efecto del péptido mimético de ApoA1, D4F, en el desarrollo del AAA experimental

Para determinar si modificar la funcionalidad de las HDL podría tener un impacto directo en la progresión del AAA, se evaluó la progresión del AAA experimental inducido por AngII en ratones ApoE $-/-$ a los cuales se inyectó intraperitonealmente D4F, un péptido mimético de ApoA1. Mediante US, se determinó el diámetro aórtico los días 0, 2, 6, 9, 15, 22 y 28 desde la infusión de AngII (*Figura 20*).

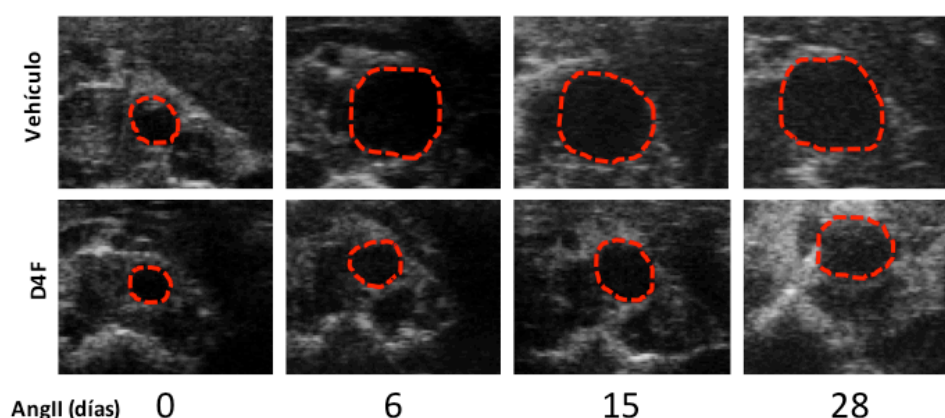


Figura 20: Efecto del péptido mimético D4F en el desarrollo del AAA en ratones ApoE $-/-$ infundidos con AngII. Imágenes de la valoración mediante ultrasonidos de las secciones de la aorta durante la progresión aneurismática (0, 6, 15 y 28 días desde la infusión de AngII) en ratones tratados con el péptido D4F y con salino.

Se observó que el máximo diámetro aórtico estaba reducido en aquellos ratones tratados con el péptido frente a los controles no tratados, $1,4 \pm 0,1$ mm vs $1,7 \pm 0,2$ mm en el día 28, de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$), tal como se muestra en la *Figura 21*.

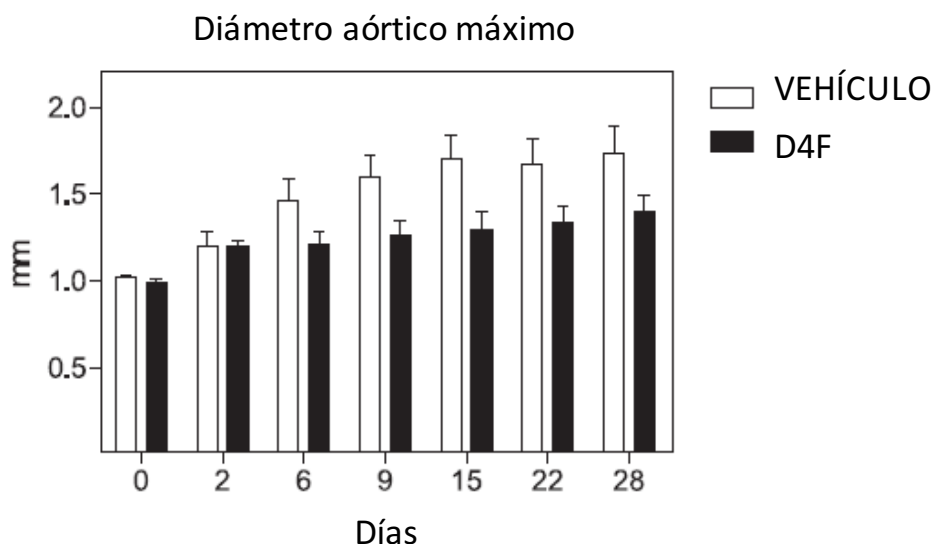


Figura 21: Efecto del péptido mimético D4F versus salino, en el desarrollo del AAA experimental.

Diámetro máximo (mm) de la aorta abdominal de los ratones a los que se administró el péptido D4F o salino (vehículo) en diferentes momentos desde la infusión de AngII (0, 2, 6, 9, 15, 22 y 28 días).

4.2 ESTUDIO PON1

4.2.1 Análisis proteómico del plasma y validación de los resultados

Las muestras de plasma fueron depleccionadas de las 14 proteínas más abundantes y, a continuación, las muestras de pacientes con AAA en rango quirúrgico, AAA en seguimiento y controles se compararon mediante conteo espectral o *spectral-counting*, utilizando la distribución β -binomial para obtener los datos de cuantificación. Se consideraron, en todos los casos, las proteínas cuantificadas al menos en dos comparativas. En las muestras de AAA en seguimiento vs las muestras control, se encontraron 17 proteínas con expresión diferencial, 12 aumentadas y 5 disminuidas (Tabla 9). En las muestras de AAA en rango quirúrgico vs el grupo control, fueron 3 las proteínas que estuvieron aumentadas, frente a 7 proteínas disminuidas (Tabla 10). Finalmente, en la comparativa entre AAA en rango quirúrgico y AAA en seguimiento, hubo una expresión diferencial de 11 proteínas, 3 de las cuales aparecieron aumentadas en el primer grupo, y las 8 restantes disminuidas (Tabla 11). Todos estos hallazgos resultaron estadísticamente significativos. En líneas generales, hubo un incremento de las proteínas relacionadas con la respuesta inmuno-inflamatoria en pacientes con AAA respecto a controles, como ocurrió con los componentes C6, C7 y C9 del complemento,

la tripsina y la α -1-antiquimiotripsina, entre otras. Exponiendo estos resultados con más detalle, y tal como se refleja en la *Tabla 9*, los componentes C6 y C7 del complemento, estuvieron 3,61 y 2,54 veces aumentados, respectivamente, en pacientes con AAA en seguimiento respecto a controles. Por su parte, el componente C9 apareció 2,09 veces más en pacientes con AAA en rango quirúrgico frente a controles. La tripsina apareció 2,94 veces incrementada en pacientes con AAA en rango quirúrgico frente a pacientes con AAA en seguimiento. La α -1-antiquimiotripsina estuvo 1,58 veces aumentada en AAA en rango quirúrgico frente a controles. Por el contrario, otras proteínas tales como el fibrinógeno o la α -2-HS-glicoproteína, aparecieron elevadas en controles frente a pacientes. La primera 1,91 veces respecto al grupo de AAA en rango quirúrgico, la segunda 2,69 veces frente al grupo de AAA en seguimiento. En varios casos, los resultados fueron coincidentes con el estudio proteómico mediante iTRAQ como es, por ejemplo, el caso de la ApoA4, cuyos niveles se presentaron reducidos en pacientes con AAA vs controles, y de ApoA1, 6 veces disminuida en pacientes con AAA en rango quirúrgico frente a pacientes con AAA en seguimiento. Sin embargo, entre todas las proteínas analizadas, el mayor interés fue hacia la PON1, proteína con un papel clave en el estrés oxidativo y que previamente no se había relacionado con el AAA. La enzima PON1 se mostró 2,69 veces reducida en muestras de plasma de AAA en seguimiento frente a las muestras de controles ($p < 0,05$) y 2,55 veces en las muestras de AAA en rango quirúrgico respecto a controles ($p < 0,05$) (*Tablas 9, 10 y 11*). Sin embargo, no se encontraron diferencias en cuanto a los niveles de PON1 entre pacientes con AAA en rango quirúrgico y en seguimiento.

Tabla 9: Diferencias en cuanto a los niveles de proteínas en plasma, identificados mediante proteómica sin marcaje LC-MS/MS, entre pacientes con AAA en seguimiento vs controles *.

AAA EN SEGUIMIENTO VS GRUPO CONTROL							
Código SP	Proteína	AAA 30-50 mm	Control	Ratio AAA 30-50 mm/Control	Fc manual	Fc	Valor de p
P02649	ApoE	16	2,12	7,56	7,56	-7,56	0
P04196	Glicoproteína rica en Histidina	44,07	6,31	6,99	6,99	-6,99	0
P02647	ApoA1	82,35	14,71	5,6	5,6	-5,6	0,01
P02751	Fibrinectina 1	9,95	2,19	4,54	4,54	-4,54	0
P02749	β 2-Glicoproteína 1	3,67	0,85	4,31	4,31	-4,31	0,01
Q06033	Cadena pesada H3 del Inhibidor de Inter- α -tripsina	19,04	4,8	3,97	3,97	-3,97	0
P35670	ATPasa 2 Transportadora de cobre	2,91	0,8	3,62	3,62	-3,62	0,04
P13671	Componente C6 del Complemento	11,37	3,15	3,61	3,61	-3,61	0
P02656	Apo C3	4,41	1,26	3,49	3,49	-3,49	0
P10643	Componente C7 del Complemento	14,3	5,63	2,54	2,54	-2,54	0
Q96PDS	N-Acetilmuramol-L-alanina amidasa	11,24	5,08	2,21	2,21	-2,21	0,01
P04114	Apo B100	251,74	138,85	1,81	1,81	-1,81	0
P19823	Cadena pesada H2 del Inhibidor de Inter- α -tripsina	120,61	259,58	0,46	2,15	2,15	0
P07477	Tripsina 1	9,02	21,6	0,42	2,39	2,39	0,01
P00450	Ceruloplasmina	130,51	334,5	0,39	2,56	2,56	0
P27169	Paroxonasa Sérica/Arilesterasa 1	1,77	4,76	0,37	2,69	2,69	0,03
P02765	α 2-HS-glicoproteína	54,38	146,26	0,37	2,69	2,69	0

Los niveles negativos de Fc (rojo), reflejan un incremento de la expresión de la proteína a estudio en el primero de los dos grupos analizados. Los valores positivos (azul) reflejan un descenso de la expresión en el primer grupo a estudio. Fc: Fold Change, número de veces que la proteína a estudio está aumentada o reducida en el primer grupo respecto al segundo.

Tabla 10: Diferencias en cuanto a los niveles de proteínas en plasma, identificados mediante proteómica sin marcaje LC-MS/MS, entre pacientes con AAA en rango quirúrgico vs controles *.

AAA EN EN RANGO QUIRÚRGICO VERSUS GRUPO CONTROL							
Código SP	Proteína	AAA >50 mm	Control	Ratio AAA >50 mm/Control	Fc manual	Fc	Valor de p
Q06033	Cadena pesada H3 del Inhibidor de Inter- α -tripsina	11,92	4,39	2,71	2,71	-2,71	1,52E-02
P02748	Componente C9 del Complemento	21,65	10,38	2,09	2,09	-2,09	8,04E-03
P01011	α -1-antiquimiotripsina	121,71	77,19	1,58	1,58	-1,58	4,59E-02
P02679	Cadena γ del Fibrinógeno	6,23	11,89	0,52	1,91	1,91	2,21E-02
P06396	Gelsolina	21,68	51,47	0,42	2,37	2,37	3,65E-03
P27169	Paroxonasa/Arilesterasa sérica 1	1,71	4,36	0,39	2,55	2,55	4,10E-02
P51884	Lumican	7	19,26	0,36	2,75	2,75	2,78E-03
P06727	Apo A4	29,78	84,55	0,35	2,84	2,84	6,29E-03
P35858	Proteína de unión al F. de Crecimiento similar a Insulina	4,2	16,36	0,26	3,89	3,89	1,27E-02
P02765	α 2-HS-glicoproteína	31,5	133,89	0,24	4,25	4,25	1,39E-04

Los niveles negativos de Fc (rojo), reflejan un incremento de la expresión de la proteína a estudio en el primero de los dos grupos analizados. Los valores positivos (azul) reflejan un descenso de la expresión en el primer grupo a estudio. Fc: Fold Change, número de veces que la proteína a estudio está aumentada o reducida en el primer grupo respecto al segundo.

Tabla 11: Diferencias en cuanto a los niveles de proteínas en plasma, identificados mediante proteómica sin marcaje LC-MS/MS, entre pacientes con AAA en rango quirúrgico vs pacientes con AAA en seguimiento *.

AAA EN RANGO QUIRÚRGICO VERSUS AAA EN SEGUIMIENTO							
Código SP	Proteína	AAA >50 mm	AAA 30-50 mm	Ratio AAA >50mm /30-50 mm	Fc manual	Fc	Valor de p
P02750	α 2-glicoproteína	10,09	2,52	4	4	-4	0,01
P00450	Ceruloplasmina	398,27	129,75	3,07	3,07	-3,07	0
P07477	Tripsina I	26,38	8,97	2,94	2,94	-2,94	0,02
P00747	Plasminógeno	22,73	47,71	0,48	2,1	2,1	0,02
P06727	Apo A4	32,35	69,26	0,47	2,14	2,14	0,03
P02746	Componente C1q del Complemento	3,3	7,11	0,46	2,15	2,15	0,02
P51884	Lumican	7,6	17,25	0,44	2,27	2,27	0,01
P05543	Globulina de unión a Tiroxina	1,95	5,41	0,36	2,77	2,77	0,02
P02647	Apo A1	13,48	81,87	0,16	6,07	6,07	0,01
P04196	Glicoproteína rica en Histidina	3,75	43,82	0,09	11,68	11,68	0

Los niveles negativos de Fc (rojo), reflejan un incremento de la expresión de la proteína a estudio en el primero de los dos grupos analizados. Los valores positivos (azul) reflejan un descenso de la expresión en el primer grupo a estudio. Fc: Fold Change, número de veces que la proteína a estudio está aumentada o reducida en el primer grupo respecto al segundo.

Para validar el resultado observado en relación con la proteína PON1, se realizó un análisis utilizando la técnica ELISA en una cohorte mayor de plasma de pacientes con AAA en rango quirúrgico (n=21), AAA en seguimiento (n=30) y controles (n=26). Las características clínicas y demográficas de los sujetos se muestran en la *Tabla 12*.

Tabla 12: Características clínicas y demográficas de los grupos estudiados en la cohorte del H. Galdakao (Bizkaia, España).

VARIABLES CLÍNICAS			
	Grupo control	AAA 3-5cm	AAA >5cm
Número	26	30	21
Sexo (hombre/mujer)	100	100	100
Edad (años \pm DE)	64,9 \pm 0,19	65,4 \pm 3,54	66,7 \pm 7,15
Dislipemia (%)	57,7	56,6	42,86
Tabaquismo activo (%)	7,7	43,3 *	33,3 *
Diabetes Mellitus (%)	7,7	16,7	19
Hipertensión (%)	26,9	70 *	61,9 *
Enfermedad cardiovascular (%)	19,2	26,7	4,7
Tratamiento hipolipemiente (estatinas) (%)	11,5	40,0 *	47,6 *

DE: Desviación estándar. * $p < 0,05$ respecto al grupo control.

Tal como se obtuvo en el análisis proteómico, la concentración de PON1 fue menor en pacientes con AAA en seguimiento y AAA en rango quirúrgico frente a sujetos control (369,1 \pm 32,5 ng/ml vs 378,9 \pm 38,1 ng/ml vs 495,6 \pm 39,6 ng/ml, $p < 0,01$, *Figura 22*).

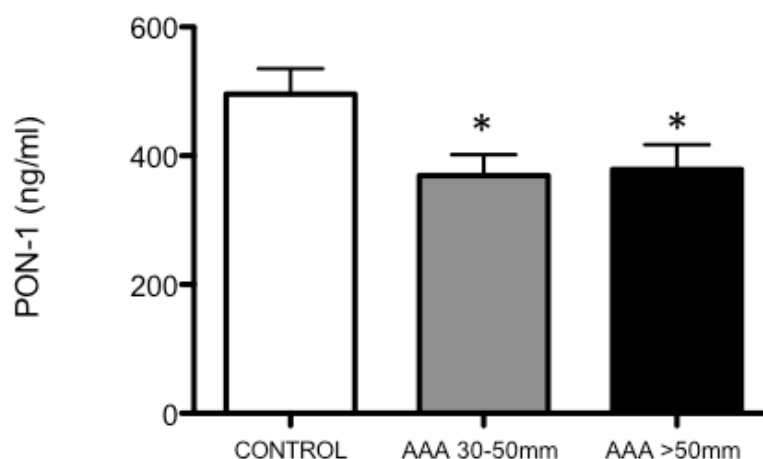


Figura 22: Niveles sistémicos de PON1. Los niveles de PON1 se midieron en el plasma de 26 sujetos control, 30 pacientes con AAA en seguimiento y 21 pacientes con AAA en rango quirúrgico (* $p < 0,05$).

No se observaron diferencias en la concentración de PON1 entre los pacientes con AAA de mayor y menor diámetro.

La *Tabla 13* muestra el análisis de regresión logística uni y multivariante para determinar los predictores de la presencia de AAA. El tabaquismo, la hipertensión y la concentración de PON1 por debajo de la media, fueron predictores independientes de la presencia de AAA, lo que persistía tras ajustar por factores de riesgo.

Tabla 13: Análisis univariante y multivariante de la concentración de PON1 con la presencia de AAA.

PRESENCIA DE AAA				
	Valores crudos		Valores ajustados	
	OR. IC 95%	p	OR. IC 95%	p
Edad	0,943 (0,84-1,06)	NS		
Tabaquismo activo	7,742 (1,65-36,41)	<0,01	5,30 (1,01-27,73)	<0,05
Hipertensión	5,428 (1,9-15,42)	<0,001	3,24 (1,01-10,37)	<0,05
Diabetes Mellitus	0,389 (0,08-1,95)	NS		
Hiperlipidemia	0,763 (0,29-1,98)	NS		
Antecedentes familiares de enfermedad CV	0,900 (0,27-3,02)	NS		
Fármacos hipolipemiantes	0,172 (0,05-0,65)	<0,01	0,32 (0,72-1,42)	NS
Concentración de PON1 por debajo de la media	0,264 (0,10-0,72)	<0,01	0,32 (0,10-0,98)	<0,05

NS: No significativo. CV: Cardiovascular. IC: Intervalo de confianza. OR: Odds Ratio.

Mediante el análisis con curva ROC se determinó que la concentración de PON1 era un predictor de la presencia de AAA (*Area under the curve* (AUC) [95% CI]=0,66 [0,55 a 0,80]; $p < 0,01$ (*Figura 23*).

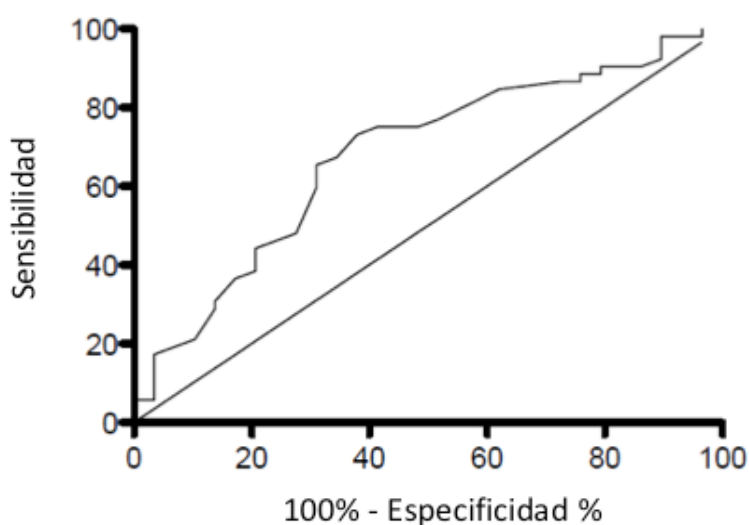


Figura 23: Curva ROC de la concentración de PON1.

4.2.2 Disminución de la actividad de PON1 en suero, tanto en el AAA experimental como humano

Dado que la actividad enzimática de PON1 debe ser determinada en suero, se obtuvieron muestras de suero de otra cohorte de pacientes con AAA en rango quirúrgico ($n=42$), AAA en seguimiento ($n=15$) y sujetos control ($n=60$). Las características clínicas se muestran en la *Tabla 14*. La disminución de la actividad de PON1 se observó en pacientes con AAA en rango quirúrgico y en seguimiento frente a sujetos control ($35,18 \pm 2,3$ UI/ml vs $40,63 \pm 2,2$ UI/ml vs $47,16 \pm 2,1$ UI/ml, $p < 0,001$) (*Figura 24*).

Tabla 14: Características clínicas y demográficas de los grupos estudiados en la cohorte del IIS-FJD (Madrid, España).

VARIABLES CLÍNICAS			
	Grupo control	AAA 3-5cm	AAA >5cm
Número	60	15	42
Sexo (hombre/mujer)	100	100	100
Edad (años \pm DE)	65,5 \pm 2,26	68,13 \pm 8,19 *	68,9 \pm 8,99 *
Dislipemia (%)	43,33	50	38,09
Tabaquismo activo (%)	38,33	54,54 *	33,33
Diabetes Mellitus (%)	21,66	7,14	9,52
Hipertensión (%)	50,85	71,43 *	57,14
Enfermedad cardiovascular (%)	15,52	42,85	26,19
Tratamiento hipolipemiante (estatinas) (%)	33,33	30,77	56,41 *

* $p < 0,05$ respecto al grupo control.

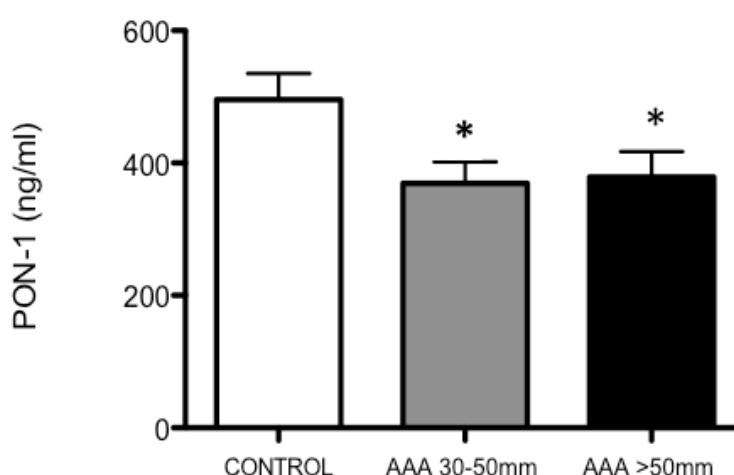


Figura 24: Actividad sistémica de PON1. La actividad de PON1 se midió en el suero de 60 sujetos control, 15 pacientes con AAA en seguimiento y 42 pacientes con AAA en rango quirúrgico ($p < 0,05$).*

No se observaron diferencias en la actividad de PON1 entre pacientes con AAA en seguimiento y en rango quirúrgico.

El análisis de regresión logística multivariante mostró que la asociación significativa entre la reducción en la actividad de PON1 y la presencia de AAA persistía tras ajustar por factores de riesgo (*Tabla 15*), y que tanto la edad como la baja actividad de PON1 eran predictores independientes de la presencia de AAA.

Tabla 15: Análisis univariante y multivariante de la actividad de PON1 con la presencia de AAA.

PRESENCIA DE AAA				
	Valores crudos		Valores ajustados	
	OR. IC 95%	p	OR. IC 95%	p
Edad	1,09 (1,02-1,17)	<0,01	1,10 (1,02-1,18)	<0,01
Tabaquismo activo	1,03 (0,48-2,20)	NS		
Hipertensión	0,67 (0,32-1,40)	NS		
Diabetes Mellitus	2,82 (0,93-8,52)	NS		
Hiperlipidemia	1,09 (0,52-2,29)	NS		
Antecedentes familiares de enfermedad CV	2,37 (0,95-5,90)	NS		
Fármacos hipolipemiantes	2,0 (0,93-4,29)	NS		
Concentración de PON1 por debajo de la media	0,41 (0,19-0,86)	<0,05	0,37 (0,17-0,80)	<0,05

NS: No significativo. CV: Cardiovascular. IC: Intervalo de confianza. OR: Odds Ratio.

Mediante el análisis con curva ROC se determinó que la actividad de PON1 era un predictor de la presencia de AAA (AUC [95% CI]=0,65 [0,54 a 0,74]; $p < 0,01$, *Figura 25*).

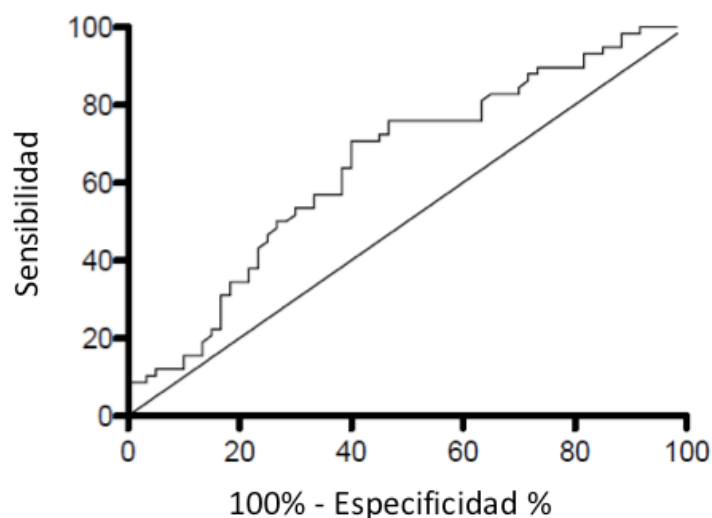


Figura 25: Curva ROC de la actividad de PON1.

A continuación se estudió la actividad de PON1 en el modelo experimental de AAA mediante infusión de elastasa. De acuerdo con los resultados encontrados en humanos, se observó que la actividad de PON1 era menor en ratones con AAA (n=10) frente a ratones sanos control (n=10) ($47,7 \pm 2,6$ versus $58,6 \pm 3,9$ UI/ml, $p < 0,05$) (*Figura 26*).

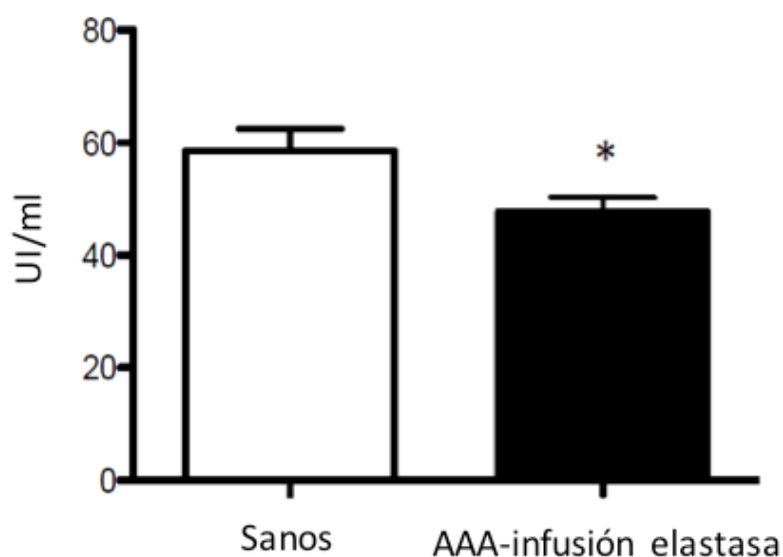


Figura 26: Medida de la actividad de PON1 en 10 ratones control frente a 10 ratones con AAA experimental mediante infusión de elastasa.

4.2.3 PON1 en tejido de AAA

En este trabajo se ha descrito, por primera vez, cómo la concentración y actividad de PON1 está reducida en suero de pacientes con AAA frente a controles. Tampoco había evidencia previa sobre la expresión tisular de PON1 en el tejido de AAA humano. Según se observa en la *Figura 27*, se detectó una fuerte tinción de PON1, principalmente en las áreas extracelulares del trombo, lo que sugería su potencial retención desde la sangre circulante. Sin embargo, tanto en la pared del AAA como en la pared arterial sana, la tinción de PON1 resultó más débil, especialmente en esta última.

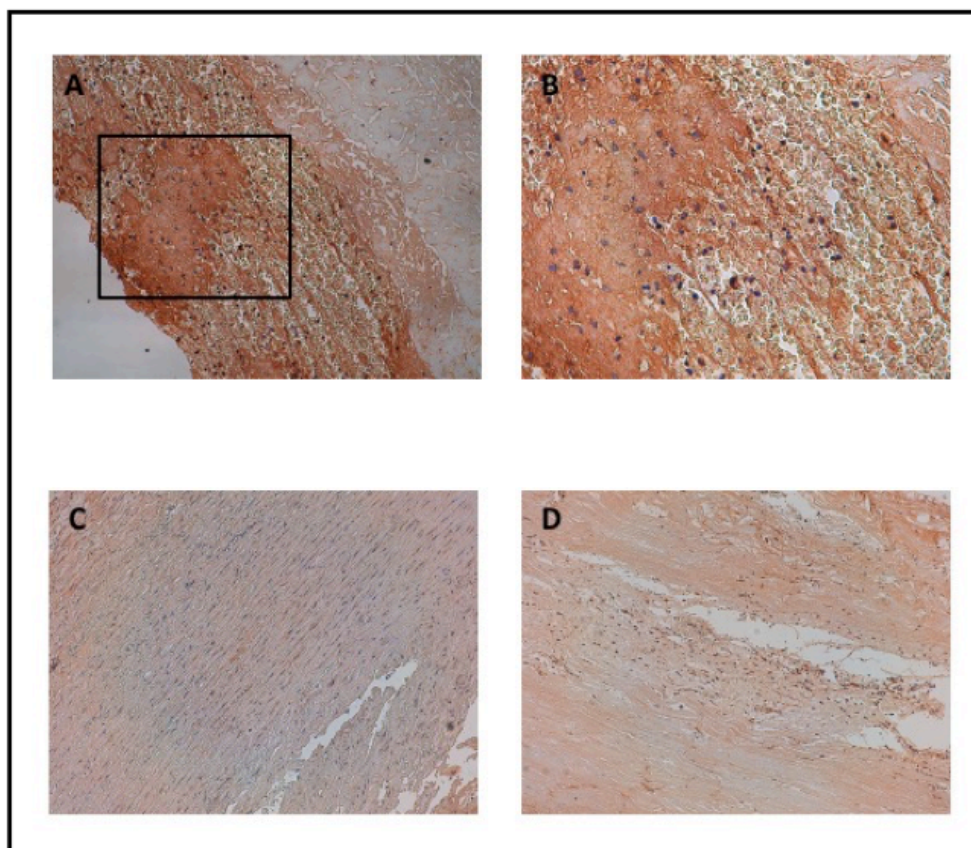


Figura 27: *Imágenes de la tinción de PON1 en tejido de AAA humano. A.- Trombo de AAA. 10X. B.- Trombo de AAA. 20X. Ampliación de imagen A (recuadro negro pequeño). C.- Pared del AAA. 10X. D.- Pared arterial sana. 10X.*

4.2.4 PON1 no se asocia con el crecimiento del AAA y la necesidad de intervención quirúrgica posterior

El papel de PON1 en la progresión del AAA fue analizado en el estudio Viborg, tal como se hizo en el caso de ApoA1/HDL. En la *Tabla 5*, expuesta previamente, se muestran las asociaciones potenciales de las características demográficas de la cohorte con la tasa de crecimiento aneurismático, identificando posibles factores de confusión. La actividad de PON1 no se relacionó con la mayor o menor velocidad de crecimiento aneurismático (*Figura 28*). No se asoció, por tanto, con la necesidad de reparación quirúrgica, en el análisis univariante ni tampoco en el multivariante.

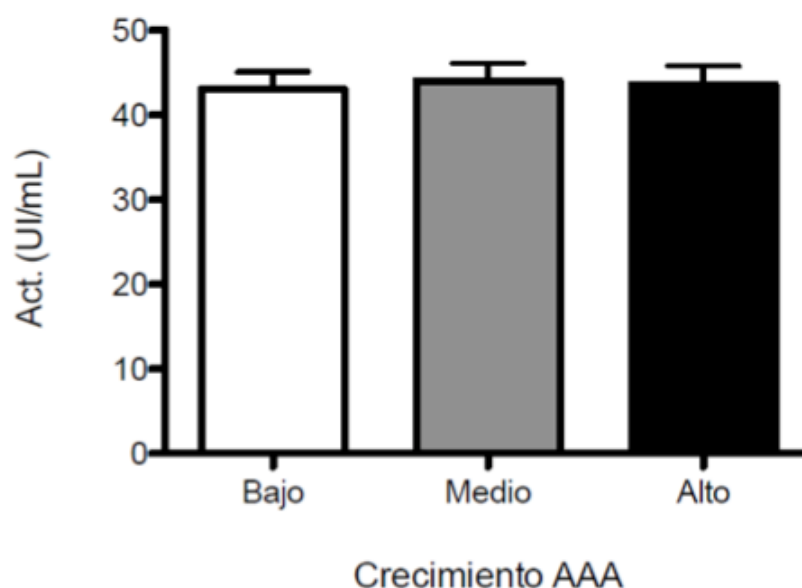


Figura 28: Actividad arilesterasa de PON1 en función del crecimiento del AAA (Estudio Viborg)

4.2.5 La sobreexpresión de PON1 previene el daño inducido por elastasa en un modelo experimental de AAA

Para determinar el papel de PON1 en el desarrollo del AAA, se desarrolló el modelo experimental de AAA de perfusión de elastasa en ratones que sobreexpresaban la proteína PON1 humana (HuTgPON1) (n=12) y WT (n=12).

El análisis 14 días después de la perfusión mostró una reducción significativa en el incremento del diámetro aórtico en los ratones HuTgPON1 respecto a los controles ($60,5 \pm 9,3$ versus $106,1 \pm 9,1\%$ de incremento, $p < 0,01$) (Figura 29).

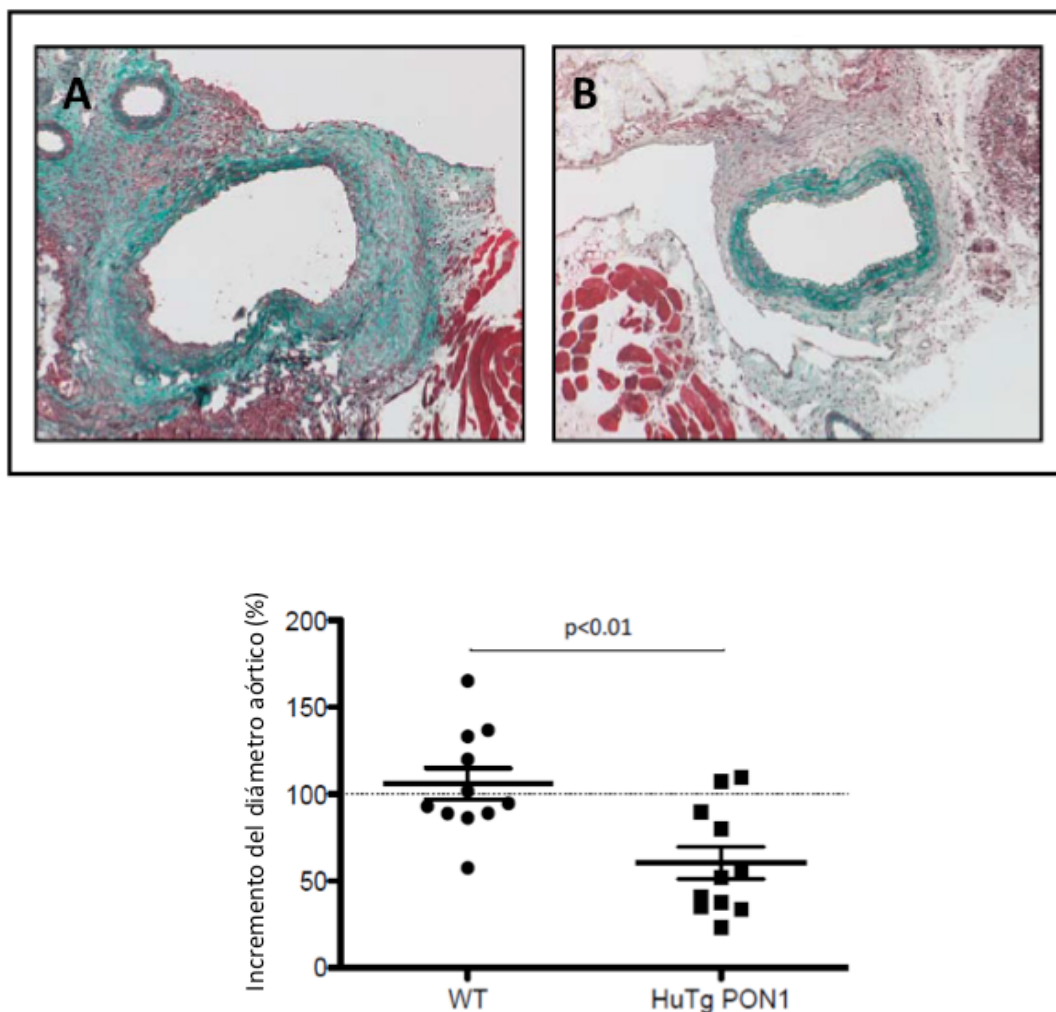


Figura 29: La sobreexpresión de PON1 reduce la dilatación aórtica en el modelo de AAA experimental por infusión de elastasa. Representación de la tinción mediante Tricrómico de Masson, el día 14 tras la perfusión, en lesiones de: A.- AAA de ratones WT. B.- AAA de ratones HuTgPON1. Incremento del diámetro aórtico (porcentaje) en el día 14 post-perfusión de elastasa en ratones WT (n=12) y ratones HuTgPON1 (n=12) (*p <0,01).

La pared aneurismática se caracteriza por una media degradada con los componentes elásticos ampliamente dañados. Para analizar si la sobreexpresión de PON1 protege frente a la degradación de la elástica, se realizó una tinción de Verhoeff Van Gieson. La preservación elástica fue clasificada partiendo de la presencia de fibras elásticas intactas (grado 1) hasta las altamente dañadas o desaparecidas (grado 4). Se observó que las fibras elásticas estaban más preservadas en los ratones HuTgPON1 que en los ratones control ($2,8 \pm 0,3$ versus $3,8 \pm 0,1$ grado, $p < 0,01$) (Figura 30).

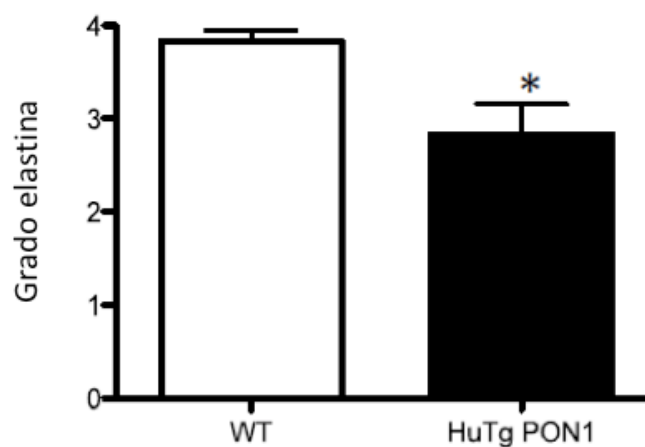
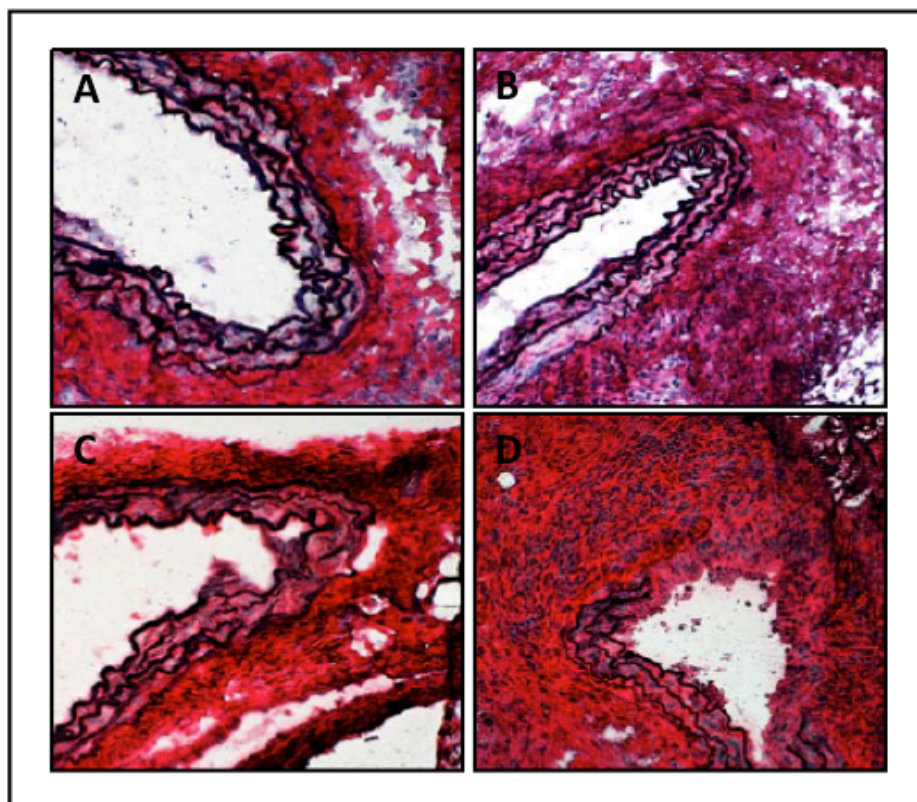


Figura 30: La sobreexpresión de *PON1* previene frente a la degradación de elastina. Tinción representativa de Verhoeff Van Gieson, mostrando la degradación de elastina clasificada en 4 grados. A.- Grado 1. B.- Grado 2. C.- Grado 3. D.- Grado 4. Cuantificación de la degradación de la elastina de la media en ratones WT (n=12) y HuTgPON1 (n=12) 14 días después de la perfusión (*p < 0,01).

4.2.6 La sobreexpresión de PON1 reduce la pérdida de CMLV y disminuye la apoptosis en el AAA experimental

La densidad de células de músculo liso de la media está disminuida en tejidos de AAA, lo que se asocia con la apoptosis de células del músculo liso ¹³⁹. En nuestro modelo experimental, la sobreexpresión de HuPON1 estuvo acompañada por una menor pérdida de CMLV, comparado con los ratones control, tal como se evidencia en la inmunohistoquímica con α -actina ($2,7 \pm 0,3$ versus $3,6 \pm 0,1$ grado, $p < 0,05$) (Figura 31).

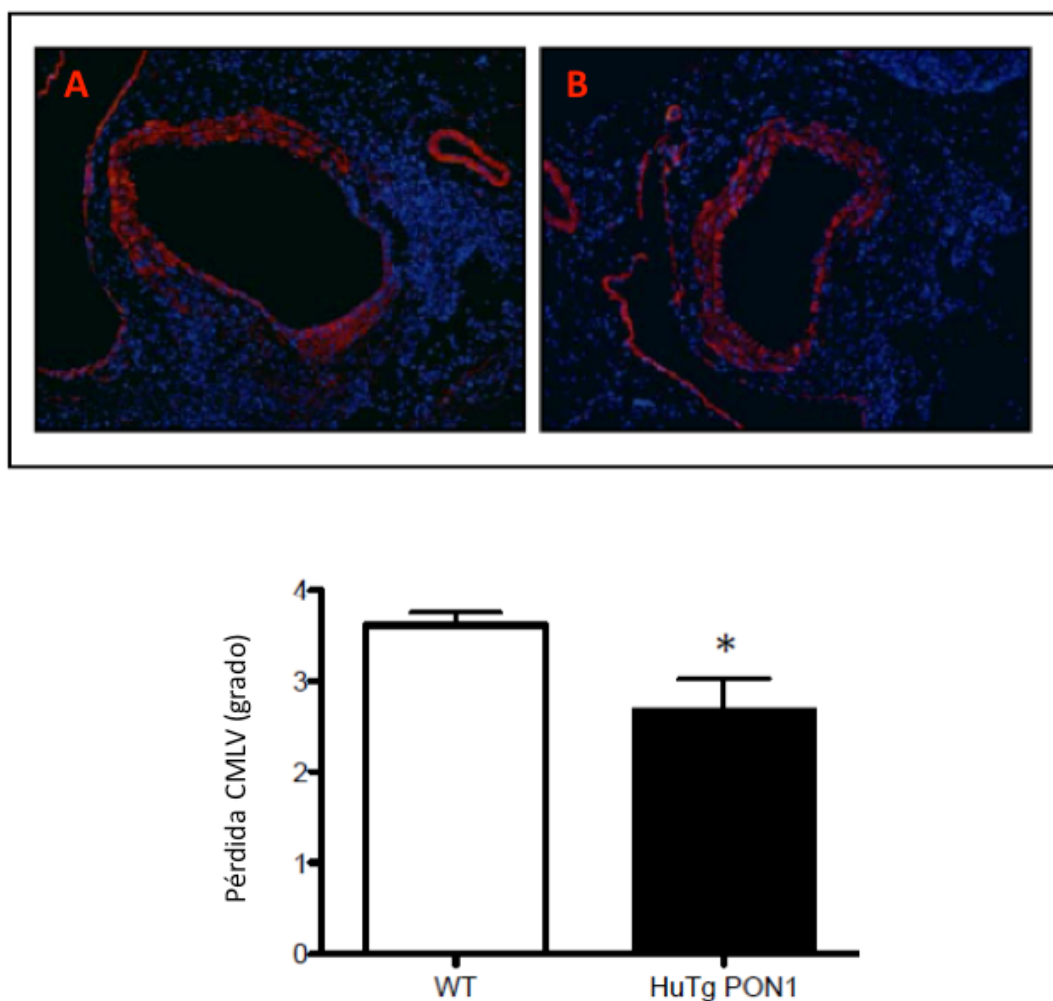


Figura 31: La sobreexpresión de PON1 previene frente a la pérdida de CMLV. Tinción representativa de las fibras de α -actina (rojo), 14 días después de la perfusión, en las lesiones de: A.- AAA de ratones WT. B.- AAA de ratones HuTgPON1. Análisis de la preservación de CMLV, mediante una escala de clasificación del daño (los valores más altos indican mayor irregularidad y pérdida de CMLV) en ratones WT (n=12) y HuTgPON1 (n=12)(*p < 0,05).

La apoptosis puede contribuir a la pérdida de CMLV de la media. Para evaluar la tasa de apoptosis de la media, se realizó una tinción del marcador apoptótico *cleaved*-PARP en los tejidos aneurismáticos. Se observó una disminución significativa de *cleaved*-PARP en los ratones HuTgPON1 frente a los ratones control, tanto en la pared (media y adventicia) ($86,4 \pm 18,9$ versus $370,4 \pm 79,5$ número de células positivas/ mm^2 , $p < 0,01$) como en la media ($257,9 \pm 72,6$ versus $507,1 \pm 78,4$ número de células positivas/ mm^2 , $p < 0,01$) (Figura 32).

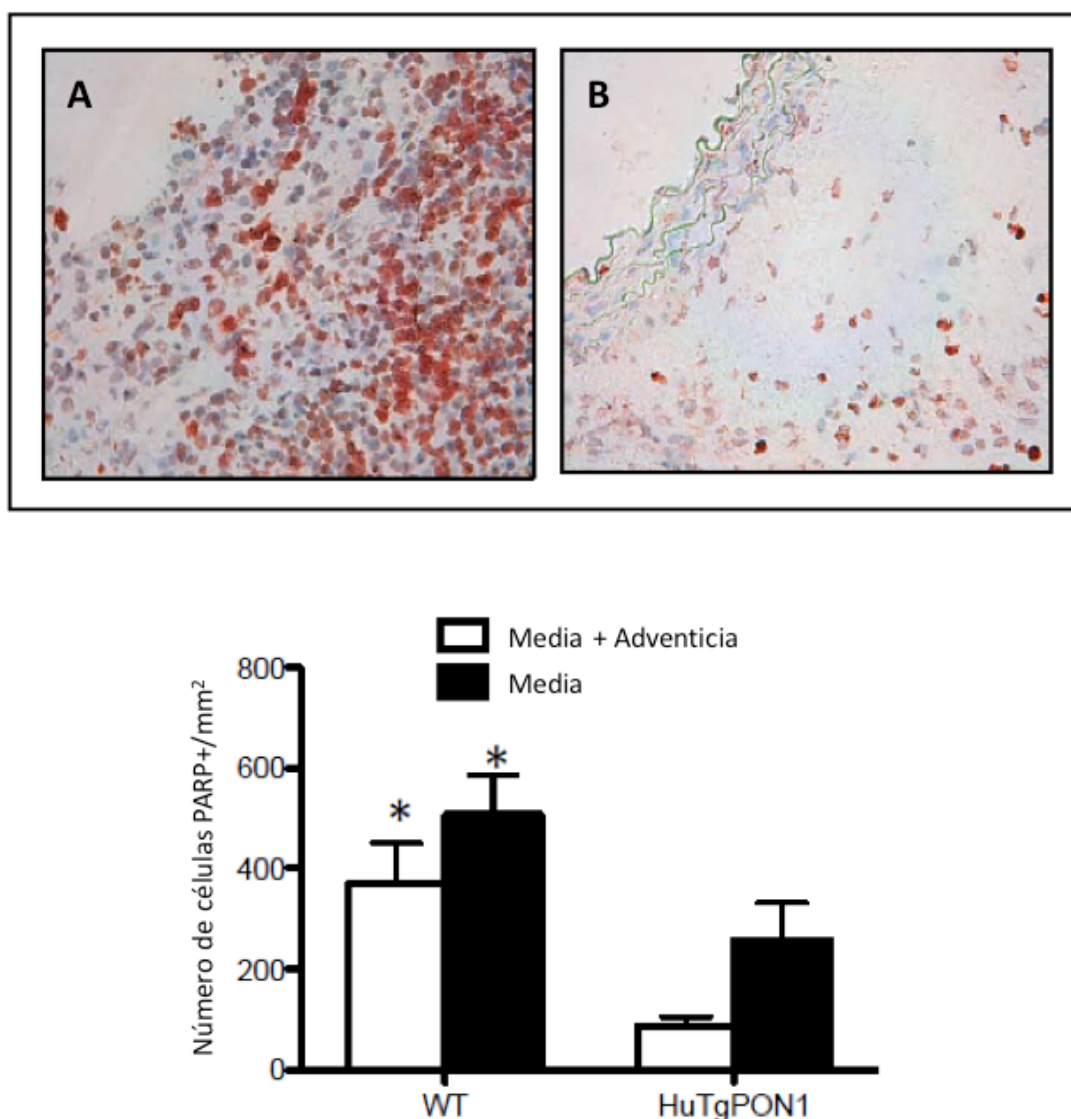


Figura 32: La sobreexpresión de PON1 previene frente a la apoptosis. Tinción de *cleaved*-PARP, 14 días después de la perfusión, en las lesiones de: A.- AAA de ratones WT. B.- AAA de ratones HuTgPON1. Cuantificación de las células positivas para PARP/ mm^2 en la pared (media + adventicia) o en la capa media, de ratones WT ($n=10$) y HuTgPON1 ($n=8$) (* $p < 0,01$).

4.2.7 La sobreexpresión de PON1 disminuye el estrés oxidativo y el contenido inflamatorio en el AAA

Las propiedades antioxidantes de PON1 están ampliamente reconocidas. Para determinar si PON1 protege al vaso del daño oxidativo, se realizó una tinción para 8-OHdG en los ratones transgénicos y control. Los ratones HuTgPON1 presentaron menor tinción del marcador de oxidación 8-OHdG al compararlos con los ratones control WT ($2,1 \pm 0,8$ versus $3,9 \pm 0,4\%$ de área positiva, $p < 0,05$) (Figura 33).

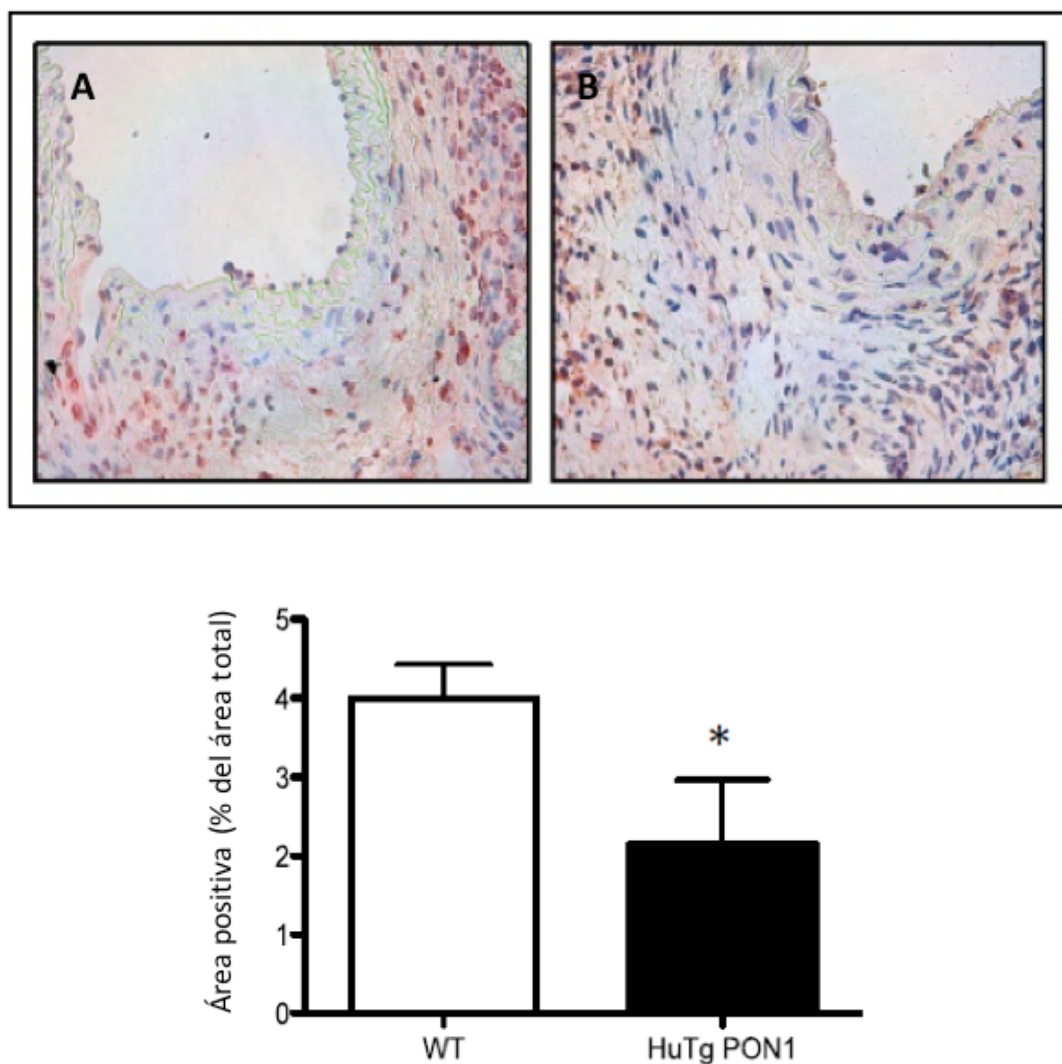


Figura 33: La sobreexpresión de PON1 previene frente al estrés oxidativo. Tinción representativa de 8-OHdG, 14 días tras la perfusión, en las lesiones de: A.- AAA de ratones WT. B.- AAA de ratones HuTgPON1. Cuantificación de la tinción positiva de 8-OHdG en lesiones de AAA de ratones WT (n=11) y HuTgPON1 (n=7) (*p < 0,05).

También los múltiples efectos antiinflamatorios de PON1 han sido claramente demostrados ¹⁴⁰ así como la implicación de los procesos inflamatorios en el desarrollo del AAA. Por este motivo se midió el infiltrado de células inflamatorias en las secciones del AAA de ratones HuTgPON1 y WT. En primer lugar se observó un descenso en la tinción de CD68 de macrófagos en los ratones HuTgPON1 frente a los ratones control ($2,2\pm0,8$ versus $9,9\pm2,8\%$ de área positiva, $p < 0,05$) (Figura 34).

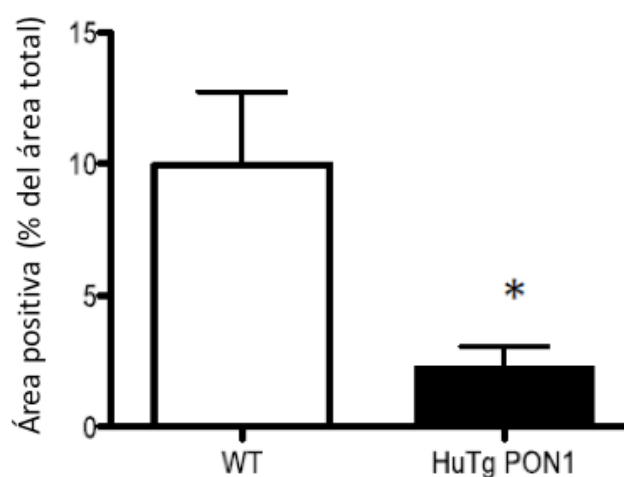
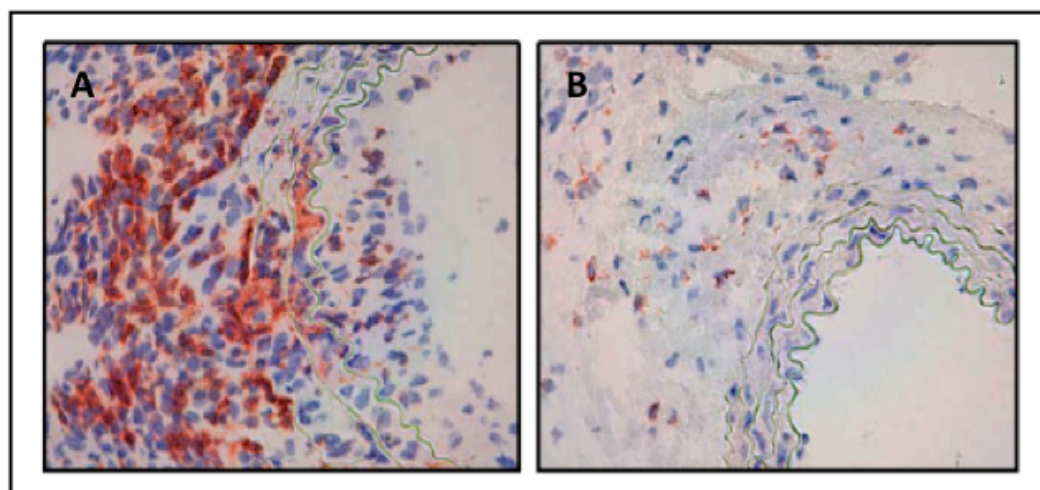


Figura 34: La sobreexpresión de PON1 previene frente a la inflamación. Tinción representativa de CD68, 14 días tras la perfusión, en las lesiones de: A.- AAA de ratones WT. B.- AAA de ratones HuTgPON1. Cuantificación de la tinción positiva de CD68 en lesiones de AAA de ratones WT (n=9) y HuTgPON1 (n=7) (* $p < 0,05$).

Por otra parte, la quimiocina MCP-1 estaba también disminuida en los ratones HuTgPON1 ($5,5\pm1,1$ versus $11,8\pm2,1$ % de área positiva, $p < 0,05$) (Figura 35).

Finalmente, en los ratones HuTgPON1 el contenido de células T y la infiltración de neutrófilos fue menor que en los ratones control ($p=0,1$ en ambos casos), pero estos resultados no alcanzaron la significación estadística.

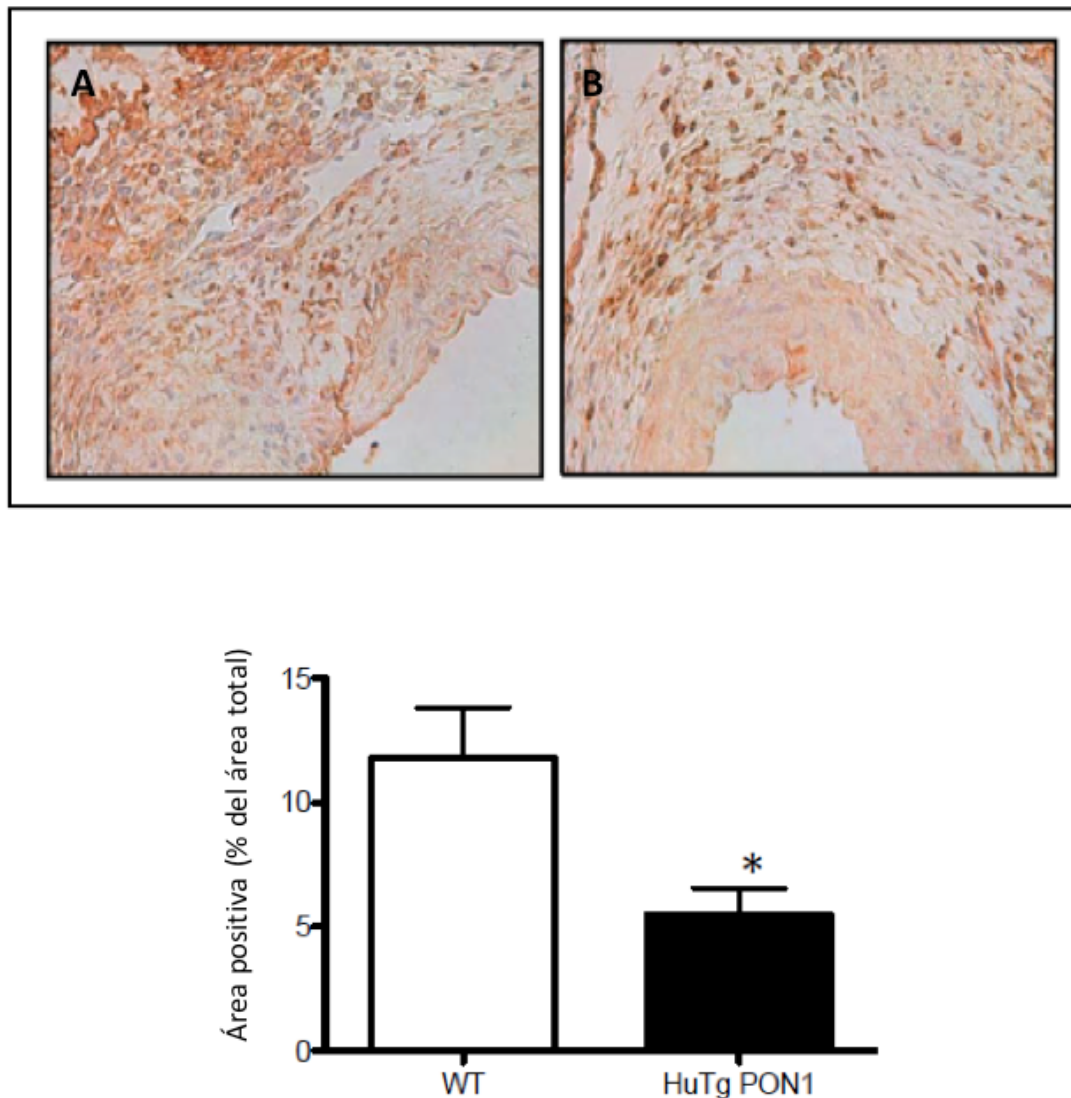


Figura 35: La sobreexpresión de PON1 previene frente a la inflamación. Tinción representativa de MCP-1, 14 días tras la perfusión, en las lesiones de: A.- AAA de ratones WT. B.- AAA de ratones HuTgPON1. Cuantificación de la tinción positiva de MCP-1 en lesiones de AAA de ratones WT ($n=10$) y HuTgPON1 ($n=8$) (* $p < 0,05$).

Todos estos datos mostraron un descenso global de los mecanismos etiopatológicos del AAA, como son el estrés oxidativo y la inflamación, en las lesiones del AAA de los ratones HuTgPON1.

5 DISCUSIÓN

5.1 ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL: SITUACIÓN ACTUAL

El AAA es una patología multifactorial cuyos mecanismos subyacentes, a día de hoy, no son completamente conocidos. Tal como se ha observado en investigaciones previas, los AAA con diámetro inferior a 5,5 cm habitualmente presentan un crecimiento lento, permaneciendo bastante estables en su evolución. Por el contrario, aquellos aneurismas con diámetro superior a 5,5 cm normalmente crecen con mayor rapidez. Es decir, el mayor diámetro aneurismático se asocia, en la mayor parte de los casos, con una mayor velocidad de crecimiento, si bien esta asociación no se ajusta a una recta de regresión lineal ¹⁴¹. Así, ateniéndonos al diámetro del AAA y teniendo en cuenta las limitaciones que ello conlleva, podemos diferenciar tres fases en su evolución. En una fase precoz, con diámetros aórticos comprendidos en el intervalo entre 3-3,9 cm, el AAA se caracteriza por una expansión lenta, por lo que el riesgo de rotura puede considerarse bajo. Aquellos AAA con diámetro 4-5,5 cm, se encuentran en la fase que podría denominarse intermedia, en la que la velocidad de crecimiento suele ser mayor; sin embargo, pese a que en esta fase la posibilidad de complicaciones se incrementa, el riesgo asociado a una posible intervención quirúrgica excede el riesgo basal del paciente, por lo que no existe indicación para la misma. Finalmente, los AAA de diámetro superior a 5,5 cm se encuentran en la fase tardía, presentando un riesgo de rotura claramente superior respecto a los grupos previos. Existe la evidencia del beneficio de una intervención quirúrgica en los pacientes que se encuentran en este último grupo. Sin embargo, tal como se ha planteado, el crecimiento del AAA es discontinuo, sin poder establecerse una velocidad de crecimiento constante ¹⁴² por lo que, en la práctica clínica, los aneurismas con el mismo diámetro no tienen por qué seguir un mismo patrón de crecimiento. Es importante recordar que en todas estas etapas, si no hay complicaciones asociadas, la enfermedad cursa de forma asintomática.

Se puede diagnosticar el AAA de forma precoz mediante pruebas de imagen, como la US o la TAC abdomino-pélvica. Estas mismas pruebas se utilizan de igual manera en el seguimiento de los pacientes para evaluar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, se trata de una enfermedad asintomática para la que, en un gran número de países, no hay un programa de *screening* establecido. Por este motivo, existe un porcentaje significativo de pacientes que no son diagnosticados, con las complicaciones que esto puede ocasionar.

A fecha de hoy, pese a las investigaciones y publicaciones al respecto, no existe ningún biomarcador de presencia y/o progresión de enfermedad con la suficiente sensibilidad y especificidad como para poder ser utilizado en la práctica clínica. Estudios previos han mostrado asociaciones significativas entre las concentraciones periféricas de determinadas proteínas y la presencia de AAA asintomáticos. En los pacientes con AAA, se ha demostrado un incremento en los niveles circulantes de las proteínas PCR¹⁴³, MMP como MMP-1 y MMP-9¹⁴⁴, MPO¹⁴⁵, homocisteína¹⁴⁶, Dímero D⁹⁷ y PAP¹⁴⁷, frente a controles sanos. Esto sugiere el papel de la actividad inflamatoria, proteolítica, fibrinolítica y oxidativa en la fisiopatología de la enfermedad. Además, algunas de las proteínas señaladas no sólo presentan una asociación directa con la presencia aneurismática, sino también con el diámetro aórtico. La importancia de esta asociación radica en que el tamaño del AAA es, por una parte, marcador subrogado de crecimiento aneurismático y, por otra, marcador de riesgo cardiovascular¹⁴⁸. Dentro de las proteínas estudiadas, existe una asociación entre la concentración de Dímero D¹⁴⁹, PAP y PCR¹⁴³ y el diámetro aneurismático. Sin embargo, tal como se ha mencionado previamente, los AAA presentan distintos niveles de crecimiento que no son dependientes únicamente de su diámetro, sino también de su morfología, actividad biológica y otros factores a estudio, de manera que se diferencian períodos de crecimiento y períodos de latencia en la progresión aneurismática. Éste es el motivo por el que no sólo es importante la asociación entre proteínas circulantes y el diámetro del AAA, sino que adquiere gran importancia el análisis asociado al crecimiento. Vega de Céniga et al demostraron la relación de proteínas como la α 1-antitripsina¹⁵⁰ o la PCR con la progresión aneurismática retrospectiva. Por otra parte, se ha observado una asociación de cistatina C, dímero D y PAP con el crecimiento prospectivo de los AAA^{97; 147}. Las evidencias más recientes, basadas en un estudio prospectivo de mayor tamaño muestral, apoyan el hecho de que aquellos pacientes que combinan un mayor número de alteraciones en los niveles de biomarcadores relacionados con AAA, se asocian de forma significativa, e independiente, con un incremento en la incidencia del AAA. Así, la presencia de varios biomarcadores relacionados con el AAA sería capaz de determinar un grupo de pacientes de alto riesgo para el desarrollo de AAA¹⁰².

En conclusión, los marcadores más empleados y estandarizados actualmente, tanto de la progresión aneurismática como del riesgo de rotura, son dos marcadores relacionados con la biomecánica de la enfermedad: el diámetro de la aorta y el crecimiento anual del

AAA. Por este motivo, existe un gran interés en identificar biomarcadores de la enfermedad capaces, no sólo de hacer un diagnóstico precoz, sino también de conocer el pronóstico de la enfermedad, tanto en el momento del diagnóstico como a lo largo de su evolución. La identificación de biomarcadores persigue también un conocimiento más profundo de la fisiopatología del AAA y de sus correspondientes vías metabólicas. Finalmente, se plantea la búsqueda de dianas terapéuticas que puedan llevarse a la práctica clínica como un tratamiento médico eficaz para este tipo de pacientes.

5.2 BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS Y PRONÓSTICOS DE AAA

5.2.1 La proteómica como herramienta en la búsqueda de biomarcadores

La proteómica consiste en el estudio de las proteínas que un sistema biológico expresa en un entorno y condiciones determinadas. Comprende el conjunto de técnicas que permiten determinar las proteínas que conforman una muestra biológica en situaciones de salud y enfermedad, o en diferentes estadios evolutivos de esta última. En este trabajo se realizó un análisis comparativo entre plasma de controles y pacientes con AAA, distinguiendo dentro de este último un grupo de pacientes con AAA en seguimiento y otro grupo con AAA en rango quirúrgico, de tal forma que se pudiesen identificar proteínas con una expresión diferencial entre las distintas situaciones clínicas.

La complejidad del proteoma del plasma humano, debido a su contenido en proteínas abundantes y a su amplio rango dinámico, convierte su análisis en todo un reto. Existen varias técnicas para eliminar estas proteínas abundantes cuya presencia interfiere con el análisis proteómico. Sin embargo, estas técnicas presentan una serie de limitaciones y, así, la depleción de proteínas mayoritarias como la albúmina puede traer consigo una pérdida no específica de otras proteínas ¹¹⁹. En nuestros estudios se optó por la utilización de la columna de depleción MARS14, basada en interacciones de afinidad, que es capaz de retener las 14 proteínas más abundantes. Cuando las muestras de plasma se hacen pasar por la columna, las proteínas abundantes, para las cuales se dispone de anticuerpos específicos, quedan retenidas. A continuación, las proteínas minoritarias, que no quedan retenidas, se eluyen y son estudiadas mediante análisis proteómico.

En el primer estudio las proteínas fueron digeridas, seguidamente, marcadas con los distintos reactivos químicos (iTRAQ) y, finalmente, fraccionadas a nivel peptídico antes de ser analizadas por LC-MS/MS. Entre las ventajas de esta técnica caben destacar las siguientes: la posibilidad de comparar varias muestras en un solo experimento, el hecho de que la cuantificación se lleva a cabo en el espectro de fragmentación, donde el ratio señal/ruido es muy superior, y el efecto aditivo que supone sumar la intensidad de las diferentes especies en un único espectro de fragmentación, lo que aumenta su sensibilidad y permite la utilización de una cantidad de muestra menor. Las determinaciones mediante esta técnica mostraron una alteración en la expresión proteica entre los diferentes grupos, algunas de las cuales resultaron estadísticamente significativas. Se observaron cambios entre el grupo de pacientes con AAA en rango quirúrgico frente a los controles, y entre los dos grupos de pacientes. Sin embargo, cabe destacar que los cambios entre controles y AAA en seguimiento no fueron significativos, lo que puede ser debido a que los cambios iniciales no son tan drásticos, a nivel sistémico, como para reflejar un cambio en el patrón diferencial cuando se analiza un número reducido de muestras. En relación a las proteínas incrementadas entre los dos grupos de pacientes, se encontró un aumento en la expresión de diferentes proteínas relacionadas con la respuesta inmuno-inflamatoria. Los reactantes de fase aguda fueron, las proteínas más abundantes, si bien son muy poco específicas de la patología. Por otra parte, tres apolipoproteínas relacionadas con el metabolismo lipídico, ApoA1, ApoA2 y ApoA4, presentaron una disminución en pacientes con AAA en rango quirúrgico frente a pacientes con AAA en seguimiento. Asimismo, se observó una disminución de ApoA1 en los pacientes con AAA en rango quirúrgico frente a controles. ApoA1 y ApoA2 son los principales componentes de la HDL, mientras que ApoA4 se secreta como un componente de los quilomicrones ricos en TG y, tras la lipólisis de dichos quilomicrones, es liberada desde la partícula circulante, bien en estado de lipoproteína libre o bien unida a la HDL ¹²⁵.

En el segundo estudio, se utilizó un abordaje proteómico sin marcaje o *label-free*. En líneas generales, hubo un incremento de las proteínas relacionadas con la respuesta inmuno-inflamatoria en pacientes con AAA respecto a controles, como ocurrió con los componentes C6, C7 y C9 del complemento. En varios casos, tal como se observa y era de esperar, los resultados fueron coincidentes con el estudio proteómico mediante iTRAQ, como ocurre con la elevación en pacientes de las proteínas de fase aguda o el

descenso de la ApoA1, que aparece disminuido en pacientes con AAA en rango quirúrgico frente a pacientes con AAA en seguimiento. En este sentido, resultó interesante plantear una metodología diferente, en el segundo trabajo, lo que permite aumentar la validez de los estudios al integrar ambos resultados. Sin embargo, entre todas las proteínas analizadas, el mayor interés fue hacia PON1, que no se detectó mediante iTRAQ, ya que no se había asociado previamente al AAA. La proteína PON1 mostró una reducción en muestras de plasma de pacientes con AAA en seguimiento o en rango quirúrgico respecto a controles. Sin embargo, no se encontraron diferencias en cuanto a los niveles de PON1 entre pacientes con AAA en rango quirúrgico y en seguimiento. La enzima PON1 es una proteína asociada a la HDL, con un papel clave en el estrés oxidativo y encargada de otorgarle también funciones antiinflamatorias y protectoras sobre el endotelio. Por todo ello, los resultados obtenidos en este segundo estudio se orientaron hacia el análisis de dicha proteína.

5.2.2 La HDL y sus proteínas constitutivas y asociadas: ApoA1 y PON1

La partícula HDL es la lipoproteína más pequeña (diámetro: 5-17 nm, peso molecular: 200-400 KDa) y densa (1,063-1,21 g/ml) y está compuesta, aproximadamente, por un 50% de lípidos y un 50% de proteínas. Está constituida por lípidos apolares en el núcleo de la partícula (colesterol esterificado y TG) y lípidos anfipáticos como el colesterol libre y los fosfolípidos, que se encuentran en la superficie de la partícula. Los lípidos se estabilizan por apolipoproteínas, situadas en la superficie de la lipoproteína. Además, la HDL contiene otras proteínas asociadas, entre las que se encuentran enzimas como la PON1, la CETP, la lipasa hepática, la lecitín colesterol aril transferasa (LCAT), proteínas de fase aguda, miembros del complemento y anti-proteasas ¹⁵¹. La biosíntesis de la HDL es un proceso complejo que incluye la síntesis y secreción de las principales apolipoproteínas componentes de la HDL, la adquisición de lípidos extracelulares (fosfolípidos y colesterol) y el ensamblaje de la HDL madura ⁶². La ApoA1 es la principal proteína de las HDL, presente en la práctica totalidad de las mismas, ⁵⁸ y la ApoA2 la segunda proteína más abundante. Las apolipoproteínas recién sintetizadas deben adquirir fosfolípidos y colesterol para generar las partículas. En esta primera etapa, las HDL adquieren una estructura discoidal ¹⁵² y constituyen el 5% de la concentración de HDL total, ya que se transforman rápidamente en HDL maduras. Al aumentar su tiempo de estancia en plasma, acumulan colesterol y otros lípidos de

manera que, finalmente, la morfología que adquieren es esférica. En esta fase, la partícula pierde la capacidad para almacenar más lípidos, por lo que deben ser depuradas del plasma o degradadas en el hígado por enzimas lipolíticas, que liberarán las apolipoproteínas. Estas proteínas formarán nuevas HDL o serán degradadas en el riñón ¹⁵³.

Numerosos estudios han demostrado la relación inversa entre las cifras de HDLc y el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular ⁶⁴. Sin embargo, ciertas observaciones sugieren las potenciales limitaciones de emplear el HDLc para una valoración del riesgo cardiovascular o como diana terapéutica en la patología cardiovascular ^{153; 154}. Se ha demostrado que la prevalencia de enfermedad coronaria presenta una correlación inversa con la capacidad de eflujo de colesterol, independientemente de los niveles de HDLc ⁶⁶. Todo esto ha llevado, en los últimos años, a un cambio de paradigma respecto al origen de la cardioprotección de la partícula HDL. Es sabido que, además de su papel en el transporte y metabolismo de lípidos mediante el transporte reverso de colesterol, la partícula exhibe otras propiedades protectoras entre las que se encuentran: propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antitrombóticas y de protección del endotelio. Por este motivo, si la concentración de colesterol que la partícula transporta no es la única responsable de la protección de la partícula, podrían ser sus proteínas constituyentes o asociadas las encargadas de las ya mencionadas funciones protectoras, es decir, de lo que se puede denominar la funcionalidad de la partícula ⁷¹.

Actualmente, se plantea el papel que pueda tener la inflamación en la patogénesis del AAA como se observa, a modo de ejemplo, en el incremento local de células inflamatorias en la aorta patológica ⁵¹. Por otra parte, las evidencias apuntan a que un desequilibrio entre la producción y eliminación de ROS, resultante en un aumento del estrés oxidativo, genera un daño tisular que se convierte en un determinante principal en el remodelado patológico crónico del AAA ²⁸. El ambiente proinflamatorio y prooxidante del AAA, favorece la modificación en la composición de las HDL, lo que inhibiría su funcionalidad ¹⁵³.

Las evidencias en la literatura señalan que ApoA1 es responsable de la principal función de la HDL: el transporte reverso del colesterol al hígado para su excreción. Basándonos en la literatura ¹⁵⁵ podemos afirmar que ApoA1 también es responsable de acciones antioxidantes, antitrombóticas y, en gran medida, antiinflamatorias como, por ejemplo, la regulación de neutrófilos activados y la reducción del estrés oxidativo de estas células

⁷⁷. En relación al papel de ApoA1 como regulador de neutrófilos activados, lo realiza a tres niveles: inhibiendo la adhesión de las células a la fibronectina, disminuyendo el estrés oxidativo y reduciendo la degranulación celular ⁷⁷.

Respecto a PON1, las evidencias en la literatura apoyan su papel antioxidante, que lleva a cabo inhibiendo la oxidación de las LDL ⁸³, hidrolizando los lípidos oxidados y estimulando la producción de la eNOS. Estas características de PON1 se han estudiado en profundidad en la patología cardiovascular ⁸⁴. Sin embargo, pese a la importancia del estrés oxidativo en el AAA, no se ha profundizado su estudio en esta patología. El estrés oxidativo en el AAA está ligado tanto a la presencia de glóbulos rojos y leucocitos, dentro del tejido, como al desequilibrio entre moléculas pro y antioxidantes ⁴³. Por una parte, la lisis de los glóbulos rojos dentro del ILT o en la adventicia de la pared, asociado a la neovascularización del AAA, puede conducir a la liberación en el tejido de Hb prooxidante, grupo hemo y hierro ^{130; 156; 157}. Por otra parte, los leucocitos producen ROS ($O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2) por diferentes mecanismos, como son la vía NADPH oxidasa o la MPO, generando peroxidación lipídica y daño oxidativo de las proteínas durante el remodelado crónico vascular.

Si el ambiente proinflamatorio y prooxidativo del AAA conlleva la modificación de las partículas de HDL, su proteína constitutiva ApoA1 y su proteína asociada PON1 pueden convertirse en proteínas disfuncionales, incapaces de llevar a cabo sus funciones protectoras y favoreciendo, por tanto, la progresión aneurismática.

5.2.3 ApoA1 y PON1 como biomarcadores diagnósticos

La identificación de biomarcadores circulantes del AAA es un tema de interés ⁹⁶. Sin embargo, actualmente no se conoce ningún marcador bioquímico de AAA con especificidad y sensibilidad suficientes como para poder ser utilizado en la práctica clínica.

Es bien conocida la relación de ApoA1/HDLc con la patología aterosclerótica ⁶⁴. Por otra parte, en pacientes con AAA se ha observado que la concentración de ApoA1/HDLc está disminuida respecto a los sujetos control. Los bajos niveles de HDLc se han considerado así como un factor de riesgo, independiente de la presencia de AAA ¹⁰². Además, el HDLc se asocia negativamente con el diámetro del AAA, tal como reflejan publicaciones previas ⁷³.

Respecto a PON1, se ha demostrado el papel potencial, a nivel diagnóstico, de la actividad de esta enzima en patología cardiovascular ⁸⁵. La reducción en los niveles y/o actividad de PON1 se ha identificado como un factor de riesgo independiente de la concentración de HDLc y ApoA1 ^{158; 159}. Sin embargo, a fecha de hoy, no hay estudios previos que relacionen PON1 con la patología del AAA.

En el presente trabajo, los estudios proteómicos reflejaron una diferencia significativa en cuanto a los niveles de ApoA1 y PON1 en pacientes con AAA en seguimiento y AAA en rango quirúrgico respecto a controles y, en el caso de ApoA1, también entre los dos grupos de pacientes con AAA. Estos resultados se validaron posteriormente en dos cohortes de mayor tamaño, con plasma de controles y pacientes en ambos estadios evolutivos, confirmándose los resultados obtenidos mediante proteómica.

En el primer estudio de validación, se confirmó la reducción de los niveles de ApoA1 en plasma de pacientes con AAA en seguimiento y en rango quirúrgico frente a controles, con resultados estadísticamente significativos, apoyando los resultados previos que sugerían a ApoA1 como un posible biomarcador diagnóstico ⁷⁹. Se realizó entonces un análisis multivariante valorando posibles factores de confusión que podrían influir en dicha asociación, observándose que la concentración de ApoA1 permanecía asociada a la presencia de AAA, de forma independiente a todos los factores estudiados. Finalmente, analizando la curva ROC, se observó que ApoA1 presenta un área bajo la curva significativa con una sensibilidad y especificidad altas. Se concluye, por tanto, que ApoA1 se asocia de forma independiente a la presencia de AAA.

En el segundo estudio se demostró que los niveles de PON1 eran significativamente más bajos en plasma de pacientes con AAA frente a controles. Por otra parte, teniendo en cuenta que PON1 es una enzima, se analizó una de sus principales actividades, la actividad arilesterasa. Se observó que no sólo la concentración sino, lo que es más importante, la actividad de PON1, estaba disminuida de forma significativa en el suero de pacientes con AAA, en seguimiento y en rango quirúrgico, respecto a sujetos control. Se analizaron los posibles factores de confusión que podrían influir en la asociación negativa de la concentración y/o actividad de PON1 con la presencia de AAA, como el tabaquismo o la hipertensión, observándose que la concentración y la actividad de PON1 permanecían asociadas a la presencia de AAA de forma independiente. Además, el estudio mediante la curva ROC confirmó, por su área bajo la curva, que tanto la concentración como la actividad de PON1 eran buenos predictores de la presencia de

AAA. Los resultados que se presentan en este trabajo demuestran, por tanto, una reducción en la actividad y concentración sistémicas de PON1, asociada a la presencia de AAA.

Estos dos estudios proponen a ApoA1 y PON1 como posibles biomarcadores diagnósticos del AAA. Sin embargo, la especificidad y sensibilidad de ambos marcadores, al menos individualmente, no es suficiente como para detectar de manera irrefutable la patología. Por otro lado, no se puede determinar si la disminución en la concentración y/o actividad de estas proteínas es causa o consecuencia del desarrollo del AAA. Estos resultados sí demuestran una evidente relación entre las dos proteínas y la presencia del AAA, lo que puede conducir a un esclarecimiento en la fisiopatología de la enfermedad.

5.2.4 ApoA1 y PON1 como biomarcadores pronósticos

Se había observado previamente que la concentración de HDLc se asocia de forma negativa con la presencia del AAA⁹⁴, convirtiéndose así en el único parámetro lipídico relacionado con la patología⁶⁵. Sin embargo, no había estudios previos que relacionasen el HDLc con el crecimiento del aneurisma. Este trabajo muestra una disminución en los niveles de ApoA1 en función del tamaño del AAA, tanto en el estudio proteómico, como en la posterior validación. Dado que el diámetro del aneurisma es un marcador subrogado de evolución de la patología, estos datos sugerían la disminución de ApoA1 durante la progresión de la enfermedad. Con objeto de apoyar la hipótesis de que ApoA1 pudiera ser un marcador de crecimiento aneurismático se planteó, en un primer estudio, el análisis de la asociación de ApoA1/HDLc con la progresión del AAA y la necesidad de una posterior reparación quirúrgica. Para ello, se analizaron los niveles de HDLc en el estudio Viborg, trabajo prospectivo de una cohorte de pacientes con AAA en rango no quirúrgico, seguidos durante una media de 8 años. La concentración de ApoA1/HDLc resultó ser un predictor independiente de la tasa de crecimiento y de la necesidad de intervención posterior en esta cohorte de seguimiento a largo plazo, demostrando que la baja concentración de ApoA1/HDLc se asocia, no sólo con la presencia de AAA, sino también con la progresión aneurismática.

De igual manera, en el segundo estudio, se planteó la posibilidad de que PON1 pudiera ser un marcador de crecimiento aneurismático. Se ha comentado previamente cómo ciertas publicaciones han demostrado el papel potencial, a nivel pronóstico, de la

actividad de PON1 en la patología cardiovascular ⁸⁵. Se decidió utilizar la misma cohorte del Estudio Viborg, determinando en este caso dos de las principales actividades de PON1, la actividad arilesterasa y la actividad paraoxonasa. No hubo, en este caso, una asociación significativa entre los niveles o actividad de PON1 y la velocidad de crecimiento aneurimático o la necesidad de intervención quirúrgica del mismo. Por tanto, si bien se puede afirmar una relación entre PON1 y la presencia de AAA, no hay evidencia de que PON1 pueda ser un marcador de crecimiento aneurismático. La concentración o actividad sérica de PON1, según los resultados obtenidos, no sería de utilidad como factor pronóstico.

5.2.5 Estudio epidemiológico.

Reiterando lo expuesto en otros apartados, se ha demostrado la relación inversa entre el HDLc y la enfermedad aterosclerótica cardiovascular ^{63; 64; 149}. Por su parte, la enfermedad cardiovascular presenta una importante asociación con el AAA ¹⁸. Nos pareció interesante, por tanto, analizar si los bajos niveles de HDLc estaban asociados con mecanismos específicos de la evolución del AAA o se asociaban de forma global con la aterosclerosis. Para ello, se analizó la concentración de HDLc en un estudio epidemiológico, utilizando dos grupos de pacientes: pacientes ateroscleróticos y pacientes con AAA en rango quirúrgico. Cabe destacar, que éste ha sido el primer gran estudio de casos-control de base poblacional en el AAA, en el que se han utilizado pacientes ateroscleróticos como grupo control. En la comparativa entre ambos grupos, se observó que los pacientes con AAA presentaban concentraciones más bajas de HDLc respecto a los pacientes ateroscleróticos, con resultados estadísticamente significativos. Estos resultados llevaron a la conclusión de que la asociación entre el HDLc y el AAA no sólo se debe a la coexistencia de este último con la patología aterosclerótica, sino que podría estar relacionada con mecanismos clave específicos del AAA.

5.3 MECANISMOS BIOLÓGICOS POTENCIALMENTE IMPLICADOS

Los mecanismos que pueden explicar la reducción de ApoA1/HDLc y PON1 en pacientes con AAA no están claramente identificados. Más aún, no es posible determinar si los bajos niveles de dichas proteínas son causa o consecuencia de la evolución aneurismática. Siendo conscientes de estas limitaciones, algunas de las causas

que podrían explicar la reducción en los niveles circulantes de dichas proteínas, en pacientes con patología aneurismática, son las que se exponen a continuación.

5.3.1 Retención en el ILT y la HDL disfuncional

Tal como hemos observado con anterioridad, es conocida la retención de ciertas proteínas abundantes del plasma a nivel del ILT ^{132; 133}. Se puede exponer, a modo de ejemplo, lo que ocurre con las proteínas del complemento. Las concentraciones de la fracción C3 del Complemento en el ILT y en la pared del AAA son mayores que en la pared aórtica sana ^{34; 160}. En este caso, se ha formulado la hipótesis de que la fracción C3 del Complemento en el trombo de la aorta aneurismática puede provenir de la retención de C3 circulante puesto que, en pacientes con un diámetro mayor de 50 mm, la concentración sérica del mismo disminuye respecto a pacientes con AAA en seguimiento (30-50 mm). De forma similar a lo que ocurre con la fracción C3 del Complemento, resulta interesante la observación de depósitos extracelulares de ApoA1 y PON1 más intensos en el ILT respecto a la pared patológica, lo que sugiere una potencial retención desde la sangre circulante. Otros grupos ¹²¹, así como el nuestro, hemos demostrado que existe una correlación negativa entre la concentración de ApoA1/HDLc circulante y el volumen del ILT, lo que podría favorecer una disminución en los niveles circulantes de ApoA1/HDLc. Por una parte, la partícula HDL es capaz de unirse a diferentes receptores presentes en las plaquetas activadas como SRB1 ¹³⁴, lo que podría explicar, al menos parcialmente, el incremento en la tinción de ApoA1 en el ILT donde las plaquetas son muy abundantes. Con respecto a esto, se había observado previamente que los pacientes sometidos a intervención coronaria percutánea con trombo, tenían menores concentraciones plasmáticas de HDLc que aquellos sometidos a PCI sin trombo ¹³⁷. Por otra parte, se ha sugerido que los cambios en la estructura y estabilidad de ApoA1, inducidos por las condiciones patológicas que se dan en el AAA, podrían favorecer el paso de una estructura organizada a una conformación irregular, proclive a su agregación en depósitos extracelulares ¹⁶¹. De hecho, se han detectado depósitos locales de ApoA1 en la íntima de la aorta de individuos de edad avanzada y en placas ateroscleróticas ^{162;163}. En un estudio reciente, el examen de homogeneizados de aortas con placas ateroscleróticas mostró un incremento de ApoA1 que fue, por encima de 100 veces, superior al de aortas sanas. Además, este mismo trabajo plantea que ApoA1 en la pared arterial se presenta en gran parte oxidada, disociada de la HDL y

disfuncional en cuanto a sus capacidades para captar colesterol y para activar LCAT. Se sugiere, por tanto, que el análisis de ApoA1 total y la funcionalidad de la HDL a nivel circulante podrían no representar lo que ocurre en la pared de la arteria ¹⁶⁴. Respecto a PON1, basándonos en este mismo planteamiento, se han observado niveles incrementados de la enzima en las placas ateroscleróticas de pacientes con enfermedad arterial periférica respecto a controles con arterias sanas ¹⁶⁵.

Las evidencias apuntan a que el estrés oxidativo juega un importante papel en la patogénesis del AAA ²⁸. En un ambiente proinflamatorio y prooxidante, pueden ocurrir modificaciones en determinadas proteínas, como la oxidación de ApoA1 por la MPO ¹⁶⁶. En este trabajo se observó la presencia de MDA, marcador de oxidación lipídica, en mayores cantidades a nivel del trombo del AAA frente a la pared aórtica patológica. Esto afianzaría la hipótesis de cómo el ambiente del AAA propicia la oxidación de la proteína ApoA1. Por otra parte, la MPO es capaz de desplazar a PON1 en la partícula de HDL ¹⁶⁶, lo cual repercute en la composición de las HDL, generándose partículas truncadas o disfuncionales, con la pérdida de sus funciones cardioprotectoras. Además, generaría una estructura modificada de la proteína, que propiciaría la retención de la HDL, junto con ApoA1 y PON1, en el trombo y, a consecuencia de ello, la posible reducción de sus niveles circulantes.

La proteína ApoA1 libre, no así unida a la HDL, es filtrada rápidamente por el riñón y, desde ahí, endocitada y degradada por las células epiteliales del túbulo proximal. Esta evidencia sugiere la posibilidad de que ApoA1 pudiera ser disociada de la macromolécula lipídica durante su transporte a través del ILT y ser degradada entonces por el riñón, lo que conduciría también a una reducción en los niveles circulantes de HDLc observados en el AAA ^{167; 168}.

Por otra parte, el ambiente proteolítico presente en el AAA podría también modificar la estructura y la composición proteica de la HDL. La partícula con mayor capacidad de captar colesterol de las células periféricas es la HDL naciente, denominada también pre β -HDL, que podría verse más afectada por la degradación proteolítica tal como ocurre en la patología aterosclerótica ¹⁶⁹. Curiosamente, la ApoA1 presente en la pre β -HDL, es la proteína de la partícula con mayor sensibilidad frente a la proteólisis en estudios *in vitro* ¹⁶⁹. La degradación proteolítica de las partículas pre β -HDL generaría un cambio, en cuanto al tipo de población predominante de HDL, perjudicial para el transporte reverso de colesterol ¹⁶⁹ que, por otra parte, reduciría los niveles circulantes

del HDLc. En esta misma línea de trabajo sobre la proteólisis se basa la reciente publicación de Sorsa et al. En ella se planteó que, puesto que las células presentes en las lesiones ateroscleróticas expresan gran cantidad de MMP-8, quizá la MMP-8 afectase a la estructura y funcionalidad de ApoA1. A través un estudio experimental se concluyó que, según la hipótesis planteada, la MMP-8 modifica mediante proteólisis a la ApoA1, reduciendo su capacidad de realizar el eflujo de colesterol ¹⁷⁰. Es bien conocido el incremento de la expresión de MMP de matriz a nivel del AAA, principalmente aquellas con capacidad elastolítica (MMP-2, MMP-9, MMP-7 y MMP-12) y colagenolítica (MMP-1, MMP-8 y MMP-13) ⁹¹. Esto hace posible plantear la posibilidad de que, localmente, ApoA1 pueda verse afectada mediante proteólisis por dichas MMP. Si bien esta hipótesis está formulada sobre hechos que ocurrirían en el tejido, es plausible plantear una posible repercusión sistémica a nivel local.

5.3.2 Otros posibles mecanismos

Según se ha expuesto, en condiciones patológicas el proteoma de la HDL puede adquirir un perfil proinflamatorio. A modo de ejemplo, el perfil proinflamatorio que adquiere la partícula HDL en el síndrome coronario agudo, hace que algunas de sus funciones pleiotrópicas se vean comprometidas ^{72;171}. Pero además, es razonable pensar que el cambio en la composición de la partícula pueda generar alteraciones en cuanto a su metabolismo, lo que justificaría a su vez el descenso en los niveles de HDLc en pacientes ateroscleróticos

Otro posible mecanismo responsable de la disminución en los niveles circulantes de ApoA1 en pacientes con AAA podría explicarse a través de los anti-ApoA1. Estos se identificaron por primera vez en pacientes afectados de Lupus Eritematoso Sistémico y Síndrome Antifosfolípido, asumiendo su papel en la trombogénesis de la enfermedad ^{172; 173}. Vuilleumier et al, demostraron que los niveles de anti-ApoA1 eran elevados en pacientes con enfermedad coronaria aguda que no asociaban patología autoinmune ¹⁷⁴, siendo también elevados en otras patologías que implican un elevado riesgo cardiovascular, como son la estenosis carotídea o la enfermedad renal terminal. Este hecho no es de extrañar, puesto que la aterosclerosis es una enfermedad con un importante componente inflamatorio, afectando, no sólo a las células vasculares, sino también a células del sistema inmune. Así, existe evidencia del papel de células B y anticuerpos en la patogénesis de la enfermedad. Concretamente, los anti-ApoA1, se han

asociado con un riesgo incrementado de eventos cardiovasculares en humanos, relacionándose con la vulnerabilidad de la placa y, consecuentemente, con una aterogénesis acelerada ¹⁷⁵. Recientemente se han planteado los anti-ApoA1 como herramienta para hacer un diagnóstico temprano del síndrome coronario agudo pudiendo ser, incluso, de mayor sensibilidad que las troponinas ¹⁷⁶. Evidentemente, esta afirmación requiere de más estudios que la soporten. Se han planteado estudios *in vitro* que han permitido determinar cómo los anti-ApoA1 podrían interferir con la producción de óxido nítrico (NO) endotelial mediada por la HDL ¹⁷⁷. Estos resultados también se han visto apoyados a través de trabajos experimentales, puesto que la inmunización pasiva de ratones con anti-ApoA1 ha incrementado la aterogénesis y la vulnerabilidad de la placa, y ha disminuido las propiedades antioxidantes de la partícula HDL mediante la inhibición de la actividad de ApoA1 ¹⁷⁵. Una de las vías a través de las cuales se plantea que los anti-ApoA1 puedan ejercer esta acción proaterogénica es mediante la oxidación de las LDL. Se postula que la presencia de LDL oxidadas en el síndrome coronario agudo pueda deberse, al menos en parte, a la presencia de anti-ApoA1, que impiden que ApoA1 proteja frente a la oxidación de las LDL ¹⁷⁸. Otra posible vía de acción es la interferencia de los anti-ApoA1 en lo que se refiere a la producción de NO mediada por la HDL ¹⁷⁷. Puesto que en el AAA existe también una implicación de todos estos procesos inflamatorios y oxidativos, se podría plantear que los anti-ApoA1 tuvieran un papel en la patogénesis del AAA lo que, consecuentemente, llevaría a una disminución en los niveles de ApoA1 circulante.

Finalmente, la reducción de los niveles de ApoA1/HDLc y PON1 en pacientes con AAA podría encontrar una explicación en la base genética de la enfermedad. El componente genético en el AAA es evidente, dada la importante asociación familiar, principalmente entre familiares de primer grado, donde llega al 15-19% ¹². Son conocidos ciertos polimorfismos genéticos de PON1 y ApoA1 que provocan una pérdida en sus funciones cardioprotectoras. Esto es lo que ocurre con el polimorfismo Q192R de PON1 que, según una reciente publicación, se ha sugerido como factor de riesgo para la enfermedad arterial coronaria en la población saudí ¹⁷⁹ y mejicana ¹⁸⁰. Es también conocido el polimorfismo de PON1-108C>T, como determinante de una menor actividad de la enzima. La presencia de este polimorfismo podría constituir un factor de riesgo para el desarrollo de AAA, independiente del tabaquismo, según ciertas publicaciones ^{181; 182}. Respecto a ApoA1, se ha asociado la presencia del polimorfismo

ApoA1-75bp con un incremento en el riesgo de dislipemia y de enfermedad coronaria^{183; 184}. Se plantea, por tanto, la hipótesis de alteraciones en la expresión proteica de ApoA1 y/o PON1, resultado de polimorfismos genéticos, como responsables de la presencia de partículas de HDL disfuncionales, lo que podría conducir a una reducción en los niveles circulantes de HDLc.

5.4 ABORDAJES TERAPÉUTICOS

La reducción de las tasas de mortalidad en el AAA se ha conseguido, principalmente, gracias a la posibilidad de una reparación quirúrgica antes de que se ocasione la rotura espontánea del mismo. Este manejo será el adecuado siempre que el AAA supere los 5,5 cm de diámetro⁶. Sin embargo, en aquellos pacientes con diámetro entre 3 y 5,5 cm, el riesgo de la intervención quirúrgica supera el riesgo de rotura, por lo que se opta por un tratamiento médico que, a día de hoy, no es una solución eficaz para este numeroso grupo de pacientes. Por este motivo, se convierte en un objetivo fundamental el encontrar un tratamiento médico capaz de modular la progresión de la enfermedad. La identificación y el estudio de biomarcadores que amplíen los conocimientos sobre la fisiopatología de la enfermedad se convierte en una necesidad también por su implicación en el aspecto terapéutico.

Tal como se ha comentado en distintos apartados, las funciones antioxidantes, antiinflamatorias y antiproteolíticas de la partícula HDL vienen determinadas, en gran medida, por sus componentes proteicos, lo que podemos denominar el proteoma de la HDL⁵⁷. Así, las consecuencias funcionales de los cambios en el proteoma de la HDL, o la presencia de partículas disfuncionales, podrían estar relacionadas con la pérdida de sus propiedades cardioprotectoras⁴³. Por ello, el estudio de dicho proteoma puede ser fundamental no sólo a nivel del conocimiento fisiopatológico, diagnóstico y pronóstico del AAA, según se ha enfocado previamente, sino también con respecto a sus posibilidades terapéuticas, encaminadas a mejorar la funcionalidad de la partícula actuando sobre sus proteínas constituyentes. Se plantea, de esta forma, optimizar estas funciones que se pueden estar viendo *truncadas* a consecuencia del ambiente patológico del AAA.

5.4.1 Mejora de la evolución del AAA experimental mediante el péptido mimético de ApoA1, D4F

Las propiedades antioxidantes de la HDL están mediadas por distintos mecanismos. Uno de ellos depende directamente de su principal proteína constituyente, ApoA1, la cual es capaz por sí sola de reducir los hidroperóxidos a hidróxidos a través de la reducción de residuos de metionina de la propia ApoA1 ¹⁸⁵. Además, está claramente demostrado que la HDL reduce la respuesta inflamatoria en leucocitos e inhibe la capacidad de las células presentadoras de antígenos, para estimular células T ¹⁸⁶. Hay también evidencia de que la HDL podría proteger contra la degradación de la matriz extracelular, la pérdida de la adhesión celular y la apoptosis de las células vasculares ¹⁸⁷; ¹⁸⁸. Dos estudios recientes en modelos experimentales de AAA han probado que incrementar los niveles de HDL podría frenar, e incluso inhibir, el desarrollo de AAA por distintos mecanismos ¹⁸⁹; ¹⁹⁰.

La posibilidad de utilizar péptidos miméticos se ha planteado, desde hace tiempo, como una posible alternativa terapéutica. Respecto a la HDL, se postuló hace ya algunos años la posibilidad de generar una partícula de HDL sintética, utilizando para ello péptidos miméticos de ApoA1. Estos mantienen la estructura de hélice anfipática de ApoA1 que permite la asociación con lípidos para formar estructuras similares a la HDL. Simulan la mayoría de las funciones ateroprotectoras de ApoA1 y son una alternativa interesante a las moléculas de ApoA1 purificadas o recombinantes, tanto por su menor coste como por la posibilidad de una producción a gran escala, además de su menor inmunogenicidad ¹⁹¹. A modo de ejemplo, se ha demostrado que dos isoformas miméticas de ApoA1, L37pA y D37pA, pueden promover *in vitro* el eflujo de colesterol y fosfolípidos desde las células mediante el transportador ABCA1 ¹⁹². Además, se observó que estas partículas debían combinarse con fosfolípidos para obtener un mayor beneficio ¹⁹³. Así, el tratamiento con estas partículas *in vitro* y en un modelo experimental, redujo los niveles de TNF α , incrementó la liberación de prostaciclina y disminuyó la disfunción contráctil tras IAM ¹⁹⁴. De forma remarcable para el uso clínico, en ciertos casos el uso de péptidos miméticos de ApoA1 se ha trasladado a pacientes ¹⁹⁴; ¹⁹⁵; ¹⁹⁶.

La búsqueda de péptidos miméticos de ApoA1 que mantuvieran sus propiedades, condujo hace ya más de 30 años a la síntesis de un péptido de 18 aminoácidos conocido

como 18A¹⁹⁷. Esta secuencia tiene la capacidad de formar una hélice anfipática de clase A, similar a las que se encuentran en ApoA1, mimetizando muchas de las capacidades de ApoA1 como ligando de lípidos¹⁹⁸. Posteriormente se demostró cómo, modificando dos residuos de fenilalanina, la afinidad hacia los lípidos se incrementaba, surgiendo el péptido 2F¹⁹⁹. Desde entonces se han sintetizado diferentes variantes de este último péptido, en función de los distintos residuos de fenilalanina¹³³. El péptido 4F pareció el más eficaz en cuanto a su capacidad para interaccionar con otros fosfolípidos¹³³. Se ha puesto también de manifiesto su capacidad para retener activamente lípidos inflamatorios, proponiéndose como un potente agente antiinflamatorio en estudios *in vitro*²⁰⁰, capaz de reducir la activación de neutrófilos⁷⁷. Respecto a los trabajos experimentales, se planteó la posibilidad de un péptido que pudiera ser administrado vía oral. Cuando 4F fue sintetizado a partir de L-aminoácidos, el péptido no se mantuvo biodisponible en la circulación, lo que se evitó utilizando una molécula a partir de D-aminoácidos. Esta molécula sí era capaz de mantener sus niveles circulantes además de convertir la HDL desde una partícula proinflamatoria a una partícula antiinflamatoria, evitar la oxidación de las partículas de LDL, minimizar el infiltrado de neutrófilos y, finalmente, generar una significativa reducción de las lesiones en los modelos de aterosclerosis²⁰¹. D4F es, por tanto, un péptido mimético de ApoA1, con potentes efectos antioxidantes y antiinflamatorios, independientes de la elevación del HDLc o la proteína ApoA1²⁰². Desde entonces, D4F se ha utilizado no sólo en diversos modelos experimentales^{155; 191; 201}, sino también en un estudio en fase I, administrándose a 50 pacientes con enfermedad coronaria, vía oral, sin aparente toxicidad o efectos adversos²⁰³. En ese estudio, no sólo se midió la composición de la partícula, sino también su funcionalidad, lo que se realizó evaluando su capacidad para prevenir la oxidación de las LDL. En el estudio, aunque no se observaron efectos respecto a los niveles de HDLc o ApoA1, la administración oral de D4F disminuyó de forma significativa el índice inflamatorio de la HDL, una de las opciones más empleadas para analizar la funcionalidad de la HDL²⁰³.

En esta Tesis Doctoral se presentan los resultados obtenidos con la utilización de D4F, inyectado intraperitonealmente, en el modelo experimental murino de AAA, mediante la perfusión con AngII. Los resultados demuestran que el tratamiento con el péptido mimético de ApoA1, disminuye significativamente la dilatación aórtica tras la infusión de AngII en ratones ApoE -/-, realizando el seguimiento por ecografía durante 28 días.

Esto sugiere que la mejora en la funcionalidad de la HDL a través de la administración del péptido mimético de ApoA1, no sólo protege frente a la patología aterosclerótica, como ya está ampliamente estudiado, sino también contra el desarrollo del AAA.

5.4.2 Mejora de la evolución del AAA experimental mediante la sobreexpresión de PON1

Otra de las propiedades antioxidantes de la HDL está mediada principalmente por un mecanismo que une y retira las moléculas dañadas por el estrés oxidativo. La HDL transporta enzimas que inhiben la formación de hidroperóxidos, como la PON1, PON3 y la glutatión peroxidasa²⁰⁴. Además, la actividad alta de PON1 se ha asociado con la protección vascular, mientras que una actividad baja de la enzima se relaciona con diferentes situaciones patológicas²⁰⁵.

En este trabajo se analizó la actividad de PON1 en el modelo experimental de AAA inducido por elastasa, observando una disminución de la actividad de PON1 en los ratones con AAA frente a los ratones sanos, similar a los resultados obtenidos en humanos. Sin embargo, no se encontraron diferencias en cuanto a los niveles de la concentración de HDLc. Se planteó entonces determinar el papel potencial de PON1 como agente modulador del desarrollo aneurismático, mediante una comparativa entre ratones WT y ratones con sobreexpresión de PON1 humana (HuTgPON1). Resultó muy interesante la observación de cómo el incremento en la actividad de PON1 en los ratones HuTgPON1, al compararlo frente a los ratones WT, conducía a un menor incremento del diámetro aórtico inducido por elastasa en el primer grupo. De forma similar, en ciertas publicaciones previas sobre la patología aterosclerótica, la sobreexpresión de PON1 en ratones ApoE -/- había generado una disminución de las lesiones ateroscleróticas generadas al compararlos frente a ratones WT, mientras que los niveles de HDLc y colesterol total permanecieron similares en ambos grupos²⁰⁶.

La dilatación aórtica se asocia a una degradación de la elastina y una depleción de CMLV en la media de la aorta. Las capas de elastina son uno de los principales componentes estructurales de la aorta. De igual forma, las CMLV son las principales productoras de la matriz extracelular y dan soporte mecánico a la pared del vaso. Como consecuencia de todo lo expuesto, la degradación de las capas de elastina y la pérdida de las CMLV están implicadas en el remodelado patológico que tiene lugar en el AAA. Con respecto a esto, la reducción en el diámetro aórtico del AAA observado en los

ratones HuTgPON1, se acompañó de una mayor conservación de la lámina elástica y del contenido en CMLV. En conjunto, podemos concluir que la sobreexpresión de PON1 previene la expansión aneurismática asociada con una menor degradación de elastina y una menor pérdida de las CMLV de la capa media.

Los efectos protectores de PON1 en la pared arterial se han relacionado principalmente con su función antioxidante. El estrés oxidativo en el AAA juega un importante papel, como se ha demostrado tanto en el AAA humano como experimental. Por una parte, en muestras de tejido de AAA humanos, se han encontrado productos de la peroxidación lipídica y de oxidación proteica avanzada ¹³⁰. Recientemente, se ha demostrado cómo la producción de O^{2-} está incrementada en muestras de aorta aneurismática frente a segmentos de aorta no dilatados, siendo las principales fuentes de O^{2-} las enzimas NADPH oxidasa e iNOS ²⁰⁷. Además, la actividad MnSOD en la aorta humana patológica fue del 65% frente a los controles, y el tejido de AAA roto tenía también baja actividad de MnSOD ⁴³. Por otra parte, respecto a los modelos experimentales de AAA, se ha observado un aumento de hierro derivado del grupo hemo, de agentes oxidantes procedentes de leucocitos, de enzimas prooxidantes, de ROS y de productos resultantes de la oxidación lipídica ^{208; 209}. Respecto a esto, en el modelo experimental de AAA inducido por elastasa realizado en el presente estudio, se ha observado también un incremento del marcador de estrés oxidativo 8-OHdG, en aquellos ratones de fenotipo salvaje, que se vio reducido en los ratones HuTgPON1. Los sistemas antioxidantes son cruciales en los tejidos para poder eliminar radicales libres y proteger a los organismos frente al estrés oxidativo. La actividad lactonasa de PON1 presenta unas propiedades antioxidantes que se han visto asociadas con la hidrólisis de los productos de la peroxidación lipídica ²⁰⁴. Además, es conocida la capacidad de PON1 para inhibir la oxidación de las LDL ⁸³. Más aún, se ha demostrado que PON1 asociada a la HDL influye en la capacidad que ésta tiene para estimular la producción de NO endotelial y para ejercer sus efectos ateroprotectores a nivel endotelial, dependientes de la síntesis de NO ²¹⁰. Los resultados obtenidos concuerdan con modelos experimentales de AAA realizados en estudios previos, que reflejan una disminución en cuanto a la dilatación aórtica y el crecimiento a través de diferentes sistemas antioxidantes ^{211; 212; 213; 214; 215}.

Sin embargo, el estrés oxidativo puede también mediar otros mecanismos en el remodelado patológico vascular, como la inflamación o la apoptosis. Se han descrito funciones antiinflamatorias e, incluso, antiapoptóticas de PON1, que pueden ser un

efecto directo o indirecto de sus propiedades antioxidantes. En un modelo para el estudio de la pared arterial, publicado previamente, aquellos ratones ApoE $-/-$ con sobreexpresión de PON1 presentaron un descenso en la expresión de MCP-1 en las placas ateroscleróticas respecto a los ratones de fenotipo salvaje. Esto estaría potencialmente asociado a una reducción en los niveles de partículas de LDL oxidadas puesto que, además, las HDL de aquellos ratones deficientes para PON1, no fueron capaces de inhibir la oxidación de las LDL ²⁰⁶. En relación a esto, en el presente trabajo se observó una reducción en el infiltrado de macrófagos en tejido de AAA de ratones HuTgPON1 respecto a ratones de tipo salvaje tras la infusión de elastasa. Un potencial mecanismo subyacente al efecto antiinflamatorio de PON1 podría estar relacionado con el descenso en la expresión de MCP-1 en AAA de ratones HuTgPON1, tras la infusión de elastasa. Por su parte, esto podría tener relación con el hecho de que PON1 inhibe la secreción de las citocinas inflamatorias TNF α y IL-6 ^{205;206;216}. Pero además, PON1 también inhibe la diferenciación monocito-macrófago ^{215;217}, de manera que la reducción del infiltrado de macrófagos a consecuencia de la sobreexpresión de PON1 podría deberse a una disminución, bien de la síntesis de MCP-1, o bien de la diferenciación de monocitos en la pared aórtica del AAA inducida por elastasa.

Finalmente, se observó una disminución en la tasa de apoptosis en la aorta de ratones HuTgPON1, algo que podría explicar la menor pérdida de CMLV en la media de la aorta de este grupo. La PON1 asociada con la partícula HDL funcional, induce la expresión de la citocina antiapoptótica Bcl-xL, mientras que la HDL en aquellos ratones PON1 $-/-$ fracasa en esta vía de inducción ^{217; 218}. Además, las células inflamatorias también son capaces de producir mediadores citotóxicos que contribuyen a la eliminación de CMLV, fuente de elastina y colágeno, menoscabando la reparación y el mantenimiento de la matriz extracelular y contribuyendo a la progresión del AAA ²¹⁹. Con respecto a ello, estudios recientes ya habían demostrado que, además de su papel como quimiocina, MCP-1 también contribuye a la progresión de la enfermedad mediante la regulación de genes que pueden causar la muerte celular ⁵³. En una publicación con el mismo modelo experimental de AAA que se utiliza en este trabajo, los ratones knock-out para MCP-1 reflejaron una reducción tanto en el infiltrado de macrófagos como en la expresión de la citocina proapoptótica FasL, lo que se vio acompañado de una disminución de la apoptosis de las CMLV ²²⁰. De esta forma, debido a una acción directa sobre la apoptosis celular o, indirectamente, mediante el

descenso del infiltrado inflamatorio o de los mediadores citotóxicos, los resultados de esta tesis muestran que PON1 juega un papel significativo en la supervivencia celular vascular, una característica fundamental en la progresión del AAA.

En resumen, la sobreexpresión de PON1 contribuye al menor crecimiento aneurismático, a la preservación de la estructura de la elastina y la densidad de CMLV, y lo hace a través de un descenso en el estrés oxidativo, la apoptosis y el infiltrado de células inflamatorias. Estos prometedores resultados permiten afirmar que, en el modelo experimental de AAA inducido por elastasa, PON1 protege frente a la progresión aneurismática, y plantean a esta proteína como una nueva potencial diana terapéutica en el tratamiento del AAA.

5.5 APLICACIONES CLÍNICAS

5.5.1 Potencial aplicación clínica de los biomarcadores analizados. Posibles limitaciones de los resultados obtenidos

Los estudios publicados hasta el momento, habían demostrado la disminución de ApoA1/HDLc en pacientes con AAA respecto a controles, así como una asociación negativa entre el HDLc y el diámetro aórtico ⁷³. Sin embargo, no existían publicaciones que relacionasen ApoA1/HDLc con el pronóstico de AAA, ni PON1 con la presencia y/o evolución del AAA.

El presente trabajo ha analizado el papel de ApoA1 y PON1 como posibles biomarcadores diagnósticos del AAA. Si bien el número de muestras analizadas en el estudio proteómico es reducido, la validación posterior utilizando una cohorte mayor de pacientes con AAA, soporta y compensa el uso de un pequeño número de muestras de plasma en la primera fase de descubrimiento. Tal como se ha expuesto, los resultados en las curvas ROC demuestran una posible aplicabilidad de estos resultados teóricos en cuanto a la ApoA1 y PON1, por ser proteínas con sensibilidad y especificidad en esta patología. Sin embargo, la cuantificación de un único parámetro como es ApoA1/HDLc y/o PON1, probablemente no sería suficiente para predecir el desarrollo del AAA, puesto que son numerosos los mecanismos implicados en esta enfermedad multifactorial. Relacionado con esto, se ha planteado que el análisis de un conjunto de biomarcadores podría ayudar en el diagnóstico o pronóstico de la enfermedad ¹⁰².

Por otra parte, mediante un estudio de carácter prospectivo, se ha sugerido el papel de ApoA1/HDLc como biomarcador pronóstico de la enfermedad. Los resultados de este estudio no fueron positivos en el caso de la enzima PON1. Respecto al estudio Viborg, si bien ha permitido llegar a resultados consistentes en cuanto al papel pronóstico de ApoA1/HDLc, presenta una serie de limitaciones que podrían mejorarse en un futuro, lo que afianzaría los resultados obtenidos y quizá permitiría obtener algún resultado positivo en el caso de PON1. Como se ha desarrollado en anteriores apartados, se trata de un estudio realizado en 112 pacientes, iniciado hace más de 20 años y con un sesgo de selección, puesto que está basado en una población procedente de un estudio de cribado, con un índice de asistencia del 77%. Además, desafortunadamente, los datos respecto a la incidencia de DM no estuvieron disponibles en el estudio Viborg, y la eliminación de la DM en el análisis multivariante del estudio danés de casos y controles redujo la asociación entre ApoA1/HDLc y la presencia de AAA, indicando la presencia de un sesgo respecto a la hipótesis nula del estudio Viborg. Junto a la diabetes, parece posible que otros procesos o factores desconocidos puedan haber influido también en los resultados del estudio Viborg como, por ejemplo, la existencia de tratamientos médicos con drogas no analizadas. Es importante destacar que no estaban prescritas estatinas en los pacientes con AAA en el momento de la recogida de las muestras. Sería interesante ampliar el tamaño muestral para llegar a resultados más consistentes, así como plantear un trabajo más reciente, con una recogida de datos más completa en cuanto a las características clínicas, y con el tratamiento farmacológico actual que requieren este tipo de pacientes.

En el caso del Registro Vascular Danés, sólo el 33% de los casos identificados tenían recogido el valor de HDLc preoperatorio, puesto que la mitad de los Centros de Dinamarca no recogen este parámetro. Dentro de los centros que sí midieron los valores de HDLc, los valores del mismo estuvieron disponibles en 85% de ellos. Además, no hubo diferencias en cuanto a la edad y el sexo respecto a los casos que habían o no medido el HDLc. En todos ellos el sesgo de selección parece poco probable. Respecto a los sesgos de información, el Registro Vascular ha demostrado ser muy válido en cuanto a los datos clínicos y a la necesidad de intervención²²¹. Además, se detectó una variabilidad interobservador muy baja respecto a la medición del diámetro aórtico máximo²²².

5.5.2 Tratamiento médico que incrementa el HDLc o su funcionalidad

Se ha comprobado, de forma consistente, que la reducción del LDLc es una estrategia efectiva y segura para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular ²²³. El tratamiento con estatinas ha mostrado importantes beneficios en cuanto a la reducción de la morbimortalidad. Sin embargo, todavía existe una proporción nada desdeñable de pacientes con concentraciones de LDLc consideradas óptimas que siguen sufriendo eventos cardiovasculares. Por este motivo es evidente que sigue existiendo la necesidad de reducir ese riesgo residual de eventos cardiovasculares. Se sabe que las bajas concentraciones de HDLc son un importante factor independiente de riesgo de enfermedad cardiovascular ²²⁴, manteniéndose para todo el espectro de concentraciones de LDL, incluso para los pacientes con concentraciones bajas de LDLc ^{225; 226; 227}. Por todo ello, la idea de incrementar la concentración de HDLc es una estrategia que se intenta aplicar desde hace ya algunos años en la aterotrombosis, si bien aún no se ha llegado a obtener grandes beneficios a través de ella. La complejidad de la HDL, que se pone de manifiesto en sus diferentes subfracciones y amplio proteoma, podría explicar la dificultad en la valoración de sus efectos.

Además, los resultados obtenidos en el estudio epidemiológico que se expusieron en los apartados previos demuestran que, si bien la aterosclerosis se asocia a un claro descenso en las cifras de HDLc, en el AAA el descenso en los niveles de HDLc es aún más acusado. Así, estos resultados sugieren que los bajos niveles de HDLc podrían estar asociados con mecanismos clave específicos de la evolución de AAA. Partiendo de estas dos premisas, sería interesante plantear un posible tratamiento dirigido al aumento en la concentración de HDLc para modular la evolución del AAA.

Existen diferentes abordajes de intervención para el aumento del HDLc, que comienza por la ya conocida modificación en los hábitos de vida. A nivel farmacológico, algunos de ellos se relacionan con los niveles de ApoA1, es decir, intervienen de forma directa en la funcionalidad de la partícula HDL. Antes de pasar a describirlos brevemente, es interesante recordar que, algunos de estos fármacos como los fibratos ^{228; 229}, tienen también una incidencia en la concentración, actividad e incluso expresión génica de PON1. Los fibratos, agonistas de los PPAR α , actúan mediante un aumento en la síntesis hepática de ApoA1 ²³⁰. De esta forma, los fibratos aumentan significativamente la concentración de HDLc ²³¹. El ácido nicotínico, presente en las niacinas, actúa a través

de la disminución del catabolismo de ApoA1, lo que también aumenta los niveles circulantes de HDLc. Se dispone de estudios piloto que han indicado su posible eficacia en la regresión de las placas de ateroma ²³². Incluso, una reciente publicación ha demostrado que el incremento del HDLc, mediante tratamiento con niacina, es capaz de reducir el volumen de la placa de ateroma carotídea evaluado mediante resonancia magnética ²³³. Sin embargo la niacina conlleva una alta tasa de efectos secundarios menores, lo que ha limitado mucho su uso hasta la fecha ²³⁴. Otro grupo son los conocidos inhibidores o moduladores de la CETP, que son capaces de incrementar los niveles de HDLc modulando la transferencia de ésteres de colesterol desde las HDL hacia las LDL. Hace años se publicaron ciertos estudios que evidenciaron un aumento de las HDL de un 30-50% con la administración de estos fármacos ^{235; 236; 237}. Tras estos resultados, se estudió el efecto del inhibidor de la CETP Torcetrapib en un gran ensayo multicéntrico (ILLUMINATE). Desgraciadamente el estudio tuvo que suspenderse de forma prematura por un aumento en la mortalidad de los pacientes del brazo en tratamiento con Torcetrapib, a pesar de objetivarse un significativo aumento de las HDL ⁶⁹. No se ha podido corroborar la causa de este fracaso, pero se plantean varias posibilidades como toxicidad vascular directa, hipertensión e interacción con el sistema renina-angiotensina-aldosterona del fármaco ²³⁸, no debidas a la inhibición de la CETP de forma directa. Otro tipo de fármacos relacionados con ApoA1 son las moléculas de HDL recombinante, constituida por ApoA1 recombinante y fosfolípidos. El tipo de HDL del que se tiene más experiencia preclínica es la HDL recombinante formada por ApoA1 Milano ¹⁹⁵. Esta proteína fue identificada por el grupo de Sirtori a finales de los años setenta, en un pueblo llamado *Limone Sul Garda* ²³⁹. Una familia de este pueblo se mostró resistente a la aterosclerosis a pesar de que su perfil lipídico presentaba bajas concentraciones de HDL y ApoA1 junto con elevadas concentraciones de TG. Se demostró que estos individuos tenían una mutación de ApoA1. Los sujetos con esta mutación de la HDL tienen una tasa muy baja de aterosclerosis, clínica y subclínica ²⁴⁰. Este hecho motivó la teoría de que la HDL mutante, conteniendo ApoA1 Milano, fuese más funcional que ApoA1 nativa ²⁴⁰. Se han realizado estudios preclínicos así como un estudio en pacientes con síndrome coronario agudo que ha corroborado la regresión de la placa de ateroma coronario ¹⁹⁵.

Desde un punto de vista experimental encontramos publicaciones recientes que apoyan la hipótesis de administrar fármacos encargados de incrementar los niveles de

ApoA1/HDLc en la patología del AAA. Aquellos ratones que recibieron fenofibrato presentaron una reducción del diámetro de la aorta suprarrenal, una disminución del arco aórtico en la tinción de Sudán IV, mayores niveles séricos de HDLc, mayores concentraciones séricas de esfingosina-1-fosfato y una mayor actividad de la cinasa codificada por el gen Akt1 y de eNOS a nivel aórtico, respecto al grupo de ratones control. Se plantea así que el fenofibrato incrementa la concentración de HDLc y de esfingosina-1-fosfato, limitando la progresión del AAA en ese modelo experimental ¹⁹⁴. Siguiendo esta línea, se planteó en una reciente publicación el efecto de la terapia con la HDL humana en un modelo de rata de AAA, obtenido mediante la infusión intraluminal de elastasa, seguida por inyecciones repetidas de *Porphyromonas gingivalis* ²⁴¹. La terapia redujo significativamente el incremento del diámetro aneurismático inducido por *Porphyromonas gingivalis*. Hubo también una reducción del diámetro aórtico en el modelo de AAA inducido únicamente por elastasa, si bien en este caso el resultado no fue estadísticamente significativo ²⁴¹.

Respecto a PON1, existen publicaciones recientes sobre trabajos experimentales que demuestran cómo la administración de PON1 recombinante mejora la funcionalidad de la partícula HDL, favoreciendo, entre otros mecanismos, el eflujo de colesterol desde estas células ²⁴². Los estudios publicados con anterioridad analizaban, principalmente, el efecto indirecto de PON1, a través de estudios *in vitro* e *in vivo*, en ratones transgénicos con sobreexpresión o déficit de la proteína ^{243; 244}. Los resultados de Aviram et al. se consolidan en una publicación posterior que demuestra cómo en aquellos ratones tratados con PON1 recombinante los macrófagos son más resistentes frente a los estímulos proinflamatorios, lo que conlleva la disminución de la síntesis de citocinas proinflamatorias, como TNF α e IL-6 ¹⁴⁰. Estos resultados, junto con los presentados en esta tesis relativos a la sobreexpresión genética de PON1, hacen pensar en la posibilidad de usar PON1 recombinante en modelos experimentales de AAA con el objetivo de prevenir el desarrollo del AAA. Las desventajas que presenta la utilización de una proteína recombinante son, principalmente, su antigenicidad y su elevado coste. Otras alternativas para incrementar los niveles de PON1 podrían ser el aislamiento de las HDL procedentes de animales con sobreexpresión de la proteína o la utilización de un péptido mimético, lo que podría administrarse a ratones WT o *knock out* para PON1 en un modelo experimental de AAA.

Según se ha expuesto en esta tesis, las posibilidades terapéuticas del AAA a través de la partícula HDL no sólo tienen que ir relacionadas con el incremento directo del HDLc. Los resultados obtenidos en los modelos experimentales de AAA, que se presentan, apoyan este hecho concluyendo que, por una parte, el tratamiento con el péptido mimético de ApoA1, D4F, disminuye la dilatación aórtica sin interferir en los niveles de HDLc y, por otra parte, la sobreexpresión de PON1 protege frente a la progresión aneurismática, lo que también resulta independiente de la concentración de HDLc.

Todo lo expuesto lleva a plantear la hipótesis de que el aumento en los niveles de HDLc y, principalmente, la mejora en la funcionalidad de la partícula, permitiría frenar los mecanismos de progresión del AAA o, al menos, modularlos de forma significativa. Estas terapias pueden ser un paso adelante en el tratamiento médico del AAA, si bien está a la espera de futuros ensayos clínicos que lo avalen.

6 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

1. Los niveles de la proteína ApoA1, están asociados negativamente con el tamaño del AAA y con el volumen del ILT.
2. La concentración de HDLc está asociada negativamente con el crecimiento del AAA y la necesidad de una posterior reparación quirúrgica.
3. La asociación negativa entre los niveles de HDLc y la presencia de AAA en rango quirúrgico no depende únicamente de la coexistencia con la patología aterosclerótica, dado que los pacientes con AAA >50 mm tienen concentraciones de HDLc significativamente menores a las observadas en pacientes con aterosclerosis avanzada.
4. La administración intraperitoneal del péptido mimético de ApoA1, D4F, disminuye el diámetro aórtico máximo de AAA en ratones ApoE -/- infundidos con AngII.
5. En pacientes con AAA en seguimiento y en rango quirúrgico, la concentración de PON1 y, lo que es más importante, su actividad, están disminuidas.
6. La sobreexpresión de la enzima PON1 previene la progresión de AAA en un modelo experimental, disminuyendo la dilatación aórtica máxima y la pérdida de capas de elastina inducida por la elastasa.
7. Los mecanismos protectores de la proteína PON1 derivados de su acción antioxidante son, principalmente, la disminución de la respuesta inflamatoria y la apoptosis de las CMLV, contribuyendo así al mantenimiento de la estructura vascular.
8. Dadas las funciones protectoras de las proteínas ApoA1 y PON1 observadas en el AAA experimental, en un futuro se podrían evaluar nuevas terapias dirigidas al incremento de la funcionalidad de la HDL para prevenir el crecimiento del AAA humano.

7 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ NORDON, I. M. et al. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. **Nat Rev Cardiol**, v. 8, n. 2, p. 92-102, Feb 2011. ISSN 1759-5010.
- ² SANDFORD, R. M. et al. The genetic basis of abdominal aortic aneurysms: a review. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 33, n. 4, p. 381-90, Apr 2007. ISSN 1078-5884.
- ³ FORSDAHL, S. H. et al. Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromsø Study, 1994-2001. **Circulation**, v. 119, n. 16, p. 2202-8, Apr 2009. ISSN 1524-4539.
- ⁴ EARNSHAW, J. J. et al. Screening for abdominal aortic aneurysms in men. **BMJ**, v. 328, n. 7448, p. 1122-4, May 2004. ISSN 1756-1833.
- ⁵ LINDHOLT, J. S. et al. Long-term benefit and cost-effectiveness analysis of screening for abdominal aortic aneurysms from a randomized controlled trial. **Br J Surg**, v. 97, n. 6, p. 826-34, Jun 2010. ISSN 1365-2168.
- ⁶ R.; B.; RUTHERFORD. **Cirugía Vascular**. 6. España.: Elsevier España S.A., 2006. 2612
- ⁷ HELLENTHAL, F. A. et al. Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. **Nat Rev Cardiol**, v. 6, n. 7, p. 464-74, Jul 2009. ISSN 1759-5010.
- ⁸ Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. **Nat Rev Cardiol**, v. 6, n. 8, p. 543-52, Aug 2009. ISSN 1759-5010.
- ⁹ VARDULAKI, K. A. et al. Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. **Br J Surg**, v. 87, n. 2, p. 195-200, Feb 2000. ISSN 0007-1323.
- ¹⁰ LEDERLE, F. A. et al. Abdominal aortic aneurysm events in the women's health initiative: cohort study. **BMJ**, v. 337, p. a1724, 2008. ISSN 1756-1833.
- ¹¹ NORMAN, P. E.; POWELL, J. T. Abdominal aortic aneurysm: the prognosis in women is worse than in men. **Circulation**, v. 115, n. 22, p. 2865-9, Jun 2007. ISSN 1524-4539.
- ¹² OGATA, T. et al. The lifetime prevalence of abdominal aortic aneurysms among siblings of aneurysm patients is eightfold higher than among siblings of

- spouses: an analysis of 187 aneurysm families in Nova Scotia, Canada. **J Vasc Surg**, v. 42, n. 5, p. 891-7, Nov 2005. ISSN 0741-5214.
- ¹³ LARSSON, E. et al. A population-based case-control study of the familial risk of abdominal aortic aneurysm. **J Vasc Surg**, v. 49, n. 1, p. 47-50; discussion 51, Jan 2009. ISSN 1097-6809.
- ¹⁴ WILMINK, T. B.; QUICK, C. R.; DAY, N. E. The association between cigarette smoking and abdominal aortic aneurysms. **J Vasc Surg**, v. 30, n. 6, p. 1099-105, Dec 1999. ISSN 0741-5214.
- ¹⁵ WONG, D. R.; WILLETT, W. C.; RIMM, E. B. Smoking, hypertension, alcohol consumption, and risk of abdominal aortic aneurysm in men. **Am J Epidemiol**, v. 165, n. 7, p. 838-45, Apr 2007. ISSN 0002-9262.
- ¹⁶ KNUUTINEN, A. et al. Smoking affects collagen synthesis and extracellular matrix turnover in human skin. **Br J Dermatol**, v. 146, n. 4, p. 588-94, Apr 2002. ISSN 0007-0963.
- ¹⁷ BRADY, A. R. et al. Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance. **Circulation**, v. 110, n. 1, p. 16-21, Jul 2004. ISSN 1524-4539.
- ¹⁸ CORNUZ, J. et al. Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of population-based screening studies. **Eur J Public Health**, v. 14, n. 4, p. 343-9, Dec 2004. ISSN 1101-1262.
- ¹⁹ FREIBERG, M. S. et al. Abdominal aortic aneurysms, increasing infrarenal aortic diameter, and risk of total mortality and incident cardiovascular disease events: 10-year follow-up data from the Cardiovascular Health Study. **Circulation**, v. 117, n. 8, p. 1010-7, Feb 2008. ISSN 1524-4539.
- ²⁰ IRIBARREN, C. et al. Traditional and novel risk factors for clinically diagnosed abdominal aortic aneurysm: the Kaiser multiphasic health checkup cohort study. **Ann Epidemiol**, v. 17, n. 9, p. 669-78, Sep 2007. ISSN 1047-2797.
- ²¹ SIMONI, G. et al. Screening study of abdominal aortic aneurysm in a general population: lipid parameters. **Cardiovasc Surg**, v. 4, n. 4, p. 445-8, Aug 1996. ISSN 0967-2109.

-
- ²² TWINE, C. P.; WILLIAMS, I. M. Systematic review and meta-analysis of the effects of statin therapy on abdominal aortic aneurysms. **Br J Surg**, v. 98, n. 3, p. 346-53, Mar 2011. ISSN 1365-2168.
- ²³ GOLLEDGE, J. et al. Association between serum lipoproteins and abdominal aortic aneurysm. **Am J Cardiol**, v. 105, n. 10, p. 1480-4, May 2010. ISSN 1879-1913.
- ²⁴ RIZZO, M. et al. LDL size and subclasses in patients with abdominal aortic aneurysm. **Int J Cardiol**, v. 134, n. 3, p. 406-8, May 2009. ISSN 1874-1754.
- ²⁵ MICHEL, J. B. et al. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. **Cardiovasc Res**, v. 90, n. 1, p. 18-27, Apr 2011. ISSN 1755-3245.
- ²⁶ CARO, C. G. Discovery of the role of wall shear in atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 2, p. 158-61, Feb 2009. ISSN 1524-4636.
- ²⁷ MEYER, C. A.; GUIVIER-CURIEN, C.; MOORE, J. E. Trans-thrombus blood pressure effects in abdominal aortic aneurysms. **J Biomech Eng**, v. 132, n. 7, p. 071005, Jul 2010. ISSN 1528-8951.
- ²⁸ MCCORMICK, M. L.; GAVRILA, D.; WEINTRAUB, N. L. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 3, p. 461-9, Mar 2007. ISSN 1524-4636.
- ²⁹ SAKALIHASAN, N.; LIMET, R.; DEFAWE, O. D. Abdominal aortic aneurysm. **Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 1577-89, 2005 Apr 30-May 6 2005. ISSN 1474-547X.
- ³⁰ ADOLPH, R. et al. Cellular content and permeability of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm. **J Vasc Surg**, v. 25, n. 5, p. 916-26, May 1997. ISSN 0741-5214.
- ³¹ LINDHOLT, J. S. et al. Low-dose aspirin may prevent growth and later surgical repair of medium-sized abdominal aortic aneurysms. **Vasc Endovascular Surg**, v. 42, n. 4, p. 329-34, 2008 Aug-Sep 2008. ISSN 1538-5744.

- ³² HOUARD, X. et al. Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. **Cardiovasc Res**, v. 82, n. 3, p. 532-41, Jun 2009. ISSN 1755-3245.
- ³³ MCCAIN, R. W.; DESSYPRIS, E. N.; CHRISTMAN, J. W. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates human polymorphonuclear leukocytes to produce interleukin-8 in vitro. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 8, n. 1, p. 28-34, Jan 1993. ISSN 1044-1549.
- ³⁴ MARTINEZ-PINNA, R. et al. Proteomic analysis of intraluminal thrombus highlights complement activation in human abdominal aortic aneurysms. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 33, n. 8, p. 2013-20, Aug 2013. ISSN 1524-4636.
- ³⁵ HOUARD, X. et al. Topology of the fibrinolytic system within the mural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. **J Pathol**, v. 212, n. 1, p. 20-8, May 2007. ISSN 0022-3417.
- ³⁶ VON KODOLITSCH, Y. et al. Intramural hematoma of the aorta: predictors of progression to dissection and rupture. **Circulation**, v. 107, n. 8, p. 1158-63, Mar 2003. ISSN 1524-4539.
- ³⁷ KAZI, M. et al. Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. **J Vasc Surg**, v. 38, n. 6, p. 1283-92, Dec 2003. ISSN 0741-5214.
- ³⁸ FONTAINE, V. et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. **Am J Pathol**, v. 161, n. 5, p. 1701-10, Nov 2002. ISSN 0002-9440.
- ³⁹ MEILHAC, O. et al. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. **FASEB J**, v. 17, n. 10, p. 1301-3, Jul 2003. ISSN 1530-6860.
- ⁴⁰ FONTAINE, V. et al. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. **Am J Pathol**, v. 164, n. 6, p. 2077-87, Jun 2004. ISSN 0002-9440.
- ⁴¹ STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1381-478, Oct 2004. ISSN 0031-9333.

-
- ⁴² DUBICK, M. A. et al. Aortic ascorbic acid, trace elements, and superoxide dismutase activity in human aneurysmal and occlusive disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 184, n. 2, p. 138-43, Feb 1987. ISSN 0037-9727.
- ⁴³ Antioxidant enzyme activity in human abdominal aortic aneurysmal and occlusive disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 220, n. 1, p. 39-45, Jan 1999. ISSN 0037-9727.
- ⁴⁴ ZHANG, J. et al. Inducible nitric oxide synthase is present in human abdominal aortic aneurysm and promotes oxidative vascular injury. **J Vasc Surg**, v. 38, n. 2, p. 360-7, Aug 2003. ISSN 0741-5214.
- ⁴⁵ BALLA, J. et al. Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 12, p. 2119-37, Dec 2007. ISSN 1523-0864.
- ⁴⁶ YAJIMA, N. et al. Oxidative stress is involved in the development of experimental abdominal aortic aneurysm: a study of the transcription profile with complementary DNA microarray. **J Vasc Surg**, v. 36, n. 2, p. 379-85, Aug 2002. ISSN 0741-5214.
- ⁴⁷ BRANDES, R. P.; KREUZER, J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. **Cardiovasc Res**, v. 65, n. 1, p. 16-27, Jan 2005. ISSN 0008-6363.
- ⁴⁸ BUSUTTIL, R. W.; ABOU-ZAMZAM, A. M.; MACHLEDER, H. I. Collagenase activity of the human aorta. A comparison of patients with and without abdominal aortic aneurysms. **Arch Surg**, v. 115, n. 11, p. 1373-8, Nov 1980. ISSN 0004-0010.
- ⁴⁹ MICHEL, J. B. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 12, p. 2146-54, Dec 2003. ISSN 1524-4636.
- ⁵⁰ ROBERTS, R. L. et al. Interaction of the inflammasome genes CARD8 and NLRP3 in abdominal aortic aneurysms. **Atherosclerosis**, v. 218, n. 1, p. 123-6, Sep 2011. ISSN 1879-1484.

- ⁵¹ SHIMIZU, K.; MITCHELL, R. N.; LIBBY, P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 5, p. 987-94, May 2006. ISSN 1524-4636.
- ⁵² CURCI, J. A. et al. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. **J Clin Invest**, v. 102, n. 11, p. 1900-10, Dec 1998. ISSN 0021-9738.
- ⁵³ HENDERSON, E. L. et al. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. **Circulation**, v. 99, n. 1, p. 96-104, 1999 Jan 5-12 1999. ISSN 0009-7322.
- ⁵⁴ HOLMES, D. R. et al. Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications. **J Vasc Surg**, v. 21, n. 5, p. 761-71; discussion 771-2, May 1995. ISSN 0741-5214.
- ⁵⁵ CHOKE, E. et al. Increased angiogenesis at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1085, p. 315-9, Nov 2006. ISSN 0077-8923.
- ⁵⁶ RYAN, S. T. et al. Transforming growth factor-beta-dependent events in vascular remodeling following arterial injury. **J Vasc Res**, v. 40, n. 1, p. 37-46, 2003 Jan-Feb 2003. ISSN 1018-1172.
- ⁵⁷ SORAN, H. et al. HDL functionality. **Curr Opin Lipidol**, v. 23, n. 4, p. 353-66, Aug 2012. ISSN 1473-6535.
- ⁵⁸ LEWIS, G. F.; RADER, D. J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. **Circ Res**, v. 96, n. 12, p. 1221-32, Jun 2005. ISSN 1524-4571.
- ⁵⁹ DANIIL, G. et al. Characterization of antioxidant/anti-inflammatory properties and apoA-I-containing subpopulations of HDL from family subjects with monogenic low HDL disorders. **Clin Chim Acta**, v. 412, n. 13-14, p. 1213-20, Jun 2011. ISSN 1873-3492.
- ⁶⁰ HARRIS, W. S. et al. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. **Atherosclerosis**, v. 197, n. 1, p. 12-24, Mar 2008. ISSN 1879-1484.

-
- ⁶¹ RYE, K. A. et al. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S195-200, Apr 2009. ISSN 0022-2275.
- ⁶² RADER, D. J. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. **J Clin Invest**, v. 116, n. 12, p. 3090-100, Dec 2006. ISSN 0021-9738.
- ⁶³ GORDON, T. et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. **Am J Med**, v. 62, n. 5, p. 707-14, May 1977. ISSN 0002-9343.
- ⁶⁴ GORDON, D. J. et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. **Circulation**, v. 79, n. 1, p. 8-15, Jan 1989. ISSN 0009-7322.
- ⁶⁵ TAKAGI, H. et al. Serum high-density and low-density lipoprotein cholesterol is associated with abdominal aortic aneurysm presence: a systematic review and meta-analysis. **Int Angiol**, v. 29, n. 4, p. 371-5, Aug 2010. ISSN 1827-1839.
- ⁶⁶ ROHATGI, A. et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. **N Engl J Med**, v. 371, n. 25, p. 2383-93, Dec 2014. ISSN 1533-4406.
- ⁶⁷ SCHWARTZ, G. G. et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. **N Engl J Med**, v. 367, n. 22, p. 2089-99, Nov 2012. ISSN 1533-4406.
- ⁶⁸ LANDRAY, M. J. et al. Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients. **N Engl J Med**, v. 371, n. 3, p. 203-12, Jul 2014. ISSN 1533-4406.
- ⁶⁹ BARTER, P. J. et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. **N Engl J Med**, v. 357, n. 21, p. 2109-22, Nov 2007. ISSN 1533-4406.
- ⁷⁰ VOIGHT, B. F. et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. **Lancet**, v. 380, n. 9841, p. 572-80, Aug 2012. ISSN 1474-547X.
- ⁷¹ VAISAR, T. et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. **J Clin Invest**, v. 117, n. 3, p. 746-56, Mar 2007. ISSN 0021-9738.

- ⁷² ALWAILI, K. et al. The HDL proteome in acute coronary syndromes shifts to an inflammatory profile. **Biochim Biophys Acta**, v. 1821, n. 3, p. 405-15, Mar 2012. ISSN 0006-3002.
- ⁷³ HELLENTHAL, F. A. et al. Circulating biomarkers and abdominal aortic aneurysm size. **J Surg Res**, v. 176, n. 2, p. 672-8, Aug 2012. ISSN 1095-8673.
- ⁷⁴ GOLLEDGE, J. et al. Measurement and determinants of infrarenal aortic thrombus volume. **Eur Radiol**, v. 18, n. 9, p. 1987-94, Sep 2008. ISSN 0938-7994.
- ⁷⁵ SEGREST, J. P. et al. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. **J Lipid Res**, v. 33, n. 2, p. 141-66, Feb 1992. ISSN 0022-2275.
- ⁷⁶ SRIVASTAVA, R. A.; SRIVASTAVA, N. High density lipoprotein, apolipoprotein A-I, and coronary artery disease. **Mol Cell Biochem**, v. 209, n. 1-2, p. 131-44, Jun 2000. ISSN 0300-8177.
- ⁷⁷ LIAO, X. L. et al. Neutrophils activation can be diminished by apolipoprotein A-I. **Life Sci**, v. 77, n. 3, p. 325-35, Jun 2005. ISSN 0024-3205.
- ⁷⁸ SHAO, B. Site-specific oxidation of apolipoprotein A-I impairs cholesterol export by ABCA1, a key cardioprotective function of HDL. **Biochim Biophys Acta**, v. 1821, n. 3, p. 490-501, Mar 2012. ISSN 0006-3002.
- ⁷⁹ AHNSTRÖM, J. et al. Plasma concentrations of apolipoproteins A-I, B and M in patients with abdominal aortic aneurysms. **Clin Biochem**, v. 43, n. 4-5, p. 407-10, Mar 2010. ISSN 1873-2933.
- ⁸⁰ MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Targeting paraoxonase-1 in atherosclerosis. **Expert Opin Ther Targets**, v. 17, n. 7, p. 829-37, Jul 2013. ISSN 1744-7631.
- ⁸¹ FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N.; AVIRAM, M. Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. **Atherosclerosis**, v. 180, n. 1, p. 55-61, May 2005. ISSN 0021-9150.
- ⁸² DEAKIN, S.; MOREN, X.; JAMES, R. W. Very low density lipoproteins provide a vector for secretion of paraoxonase-1 from cells. **Atherosclerosis**, v. 179, n. 1, p. 17-25, Mar 2005. ISSN 0021-9150.

-
- ⁸³ KONTUSH, A.; CHAPMAN, M. J. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. **Curr Opin Lipidol**, v. 21, n. 4, p. 312-8, Aug 2010. ISSN 1473-6535.
- ⁸⁴ GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. **Clin Chim Acta**, v. 439, p. 5-13, Jan 2015. ISSN 1873-3492.
- ⁸⁵ TANG, W. H. et al. Clinical and genetic association of serum paraoxonase and arylesterase activities with cardiovascular risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 11, p. 2803-12, Nov 2012. ISSN 1524-4636.
- ⁸⁶ BHATTACHARYYA, T. et al. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. **JAMA**, v. 299, n. 11, p. 1265-76, Mar 2008. ISSN 1538-3598.
- ⁸⁷ ZARAGOZA, C. et al. Animal models of cardiovascular diseases. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 497841, 2011. ISSN 1110-7251.
- ⁸⁸ CHAER, R. A. et al. Models of abdominal aortic aneurysm: characterization and clinical applications. **Vascular**, v. 14, n. 6, p. 343-52, 2006 Nov-Dec 2006. ISSN 1708-5381.
- ⁸⁹ SILENCE, J. et al. Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (MMP-3) gene inactivation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 9, p. 1440-5, Sep 2001. ISSN 1524-4636.
- ⁹⁰ SILENCE, J.; COLLEN, D.; LIJNEN, H. R. Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. **Circ Res**, v. 90, n. 8, p. 897-903, May 2002. ISSN 1524-4571.
- ⁹¹ PYO, R. et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. **J Clin Invest**, v. 105, n. 11, p. 1641-9, Jun 2000. ISSN 0021-9738.
- ⁹² LIZARBE, T. R. et al. Nitric oxide induces the progression of abdominal aortic aneurysms through the matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN. **Am J Pathol**, v. 175, n. 4, p. 1421-30, Oct 2009. ISSN 1525-2191.

- ⁹³ THOMPSON, R. W. et al. Pathophysiology of abdominal aortic aneurysms: insights from the elastase-induced model in mice with different genetic backgrounds. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1085, p. 59-73, Nov 2006. ISSN 0077-8923.
- ⁹⁴ DAUGHERTY, A.; MANNING, M. W.; CASSIS, L. A. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. **J Clin Invest**, v. 105, n. 11, p. 1605-12, Jun 2000. ISSN 0021-9738.
- ⁹⁵ DEGUCHI, J. O. et al. Genetically engineered resistance for MMP collagenases promotes abdominal aortic aneurysm formation in mice infused with angiotensin II. **Lab Invest**, v. 89, n. 3, p. 315-26, Mar 2009. ISSN 1530-0307.
- ⁹⁶ URBONAVICIUS, S. et al. Potential circulating biomarkers for abdominal aortic aneurysm expansion and rupture--a systematic review. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 36, n. 3, p. 273-80; discussion 281-2, Sep 2008. ISSN 1532-2165.
- ⁹⁷ GOLLEDGE, J. et al. Evaluation of the diagnostic and prognostic value of plasma D-dimer for abdominal aortic aneurysm. **Eur Heart J**, v. 32, n. 3, p. 354-64, Feb 2011. ISSN 1522-9645.
- ⁹⁸ SANGIORGI, G. et al. Plasma levels of metalloproteinases-3 and -9 as markers of successful abdominal aortic aneurysm exclusion after endovascular graft treatment. **Circulation**, v. 104, n. 12 Suppl 1, p. I288-95, Sep 2001. ISSN 1524-4539.
- ⁹⁹ RAMOS-MOZO, P. et al. Increased plasma levels of NGAL, a marker of neutrophil activation, in patients with abdominal aortic aneurysm. **Atherosclerosis**, v. 220, n. 2, p. 552-6, Feb 2012. ISSN 1879-1484.
- ¹⁰⁰ WALLINDER, J.; BERGQVIST, D.; HENRIKSSON, A. E. Haemostatic markers in patients with abdominal aortic aneurysm and the impact of aneurysm size. **Thromb Res**, v. 124, n. 4, p. 423-6, Sep 2009. ISSN 1879-2472.
- ¹⁰¹ KASASHIMA, S. et al. A new clinicopathological entity of IgG4-related inflammatory abdominal aortic aneurysm. **J Vasc Surg**, v. 49, n. 5, p. 1264-71; discussion 1271, May 2009. ISSN 1097-6809.

- ¹⁰² FOLSOM, A. R. et al. Circulating Biomarkers and Abdominal Aortic Aneurysm Incidence: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Circulation**, v. 132, n. 7, p. 578-85, Aug 2015. ISSN 1524-4539.
- ¹⁰³ ARAB, S. et al. Cardiovascular proteomics: tools to develop novel biomarkers and potential applications. **J Am Coll Cardiol**, v. 48, n. 9, p. 1733-41, Nov 2006. ISSN 1558-3597.
- ¹⁰⁴ WILKINS, M. R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology (N Y)**, v. 14, n. 1, p. 61-5, Jan 1996. ISSN 0733-222X.
- ¹⁰⁵ BLANCO-COLIO, L. M. et al. Vascular proteomics and the discovery process of clinical biomarkers: The case of TWEAK. **Proteomics Clin Appl**, v. 5, n. 5-6, p. 281-8, Jun 2011. ISSN 1862-8354.
- ¹⁰⁶ MARTINEZ-PINNA, R. et al. Identification of novel biomarkers of abdominal aortic aneurysms by 2D-DIGE and MALDI-MS from AAA-thrombus-conditioned media. **Methods Mol Biol**, v. 1000, p. 91-101, 2013. ISSN 1940-6029..
- ¹⁰⁷ TUÑÓN, J. et al. Proteomic strategies in the search of new biomarkers in atherothrombosis. **J Am Coll Cardiol**, v. 55, n. 19, p. 2009-16, May 2010. ISSN 1558-3597.
- ¹⁰⁸ BLANCO-COLIO, L. M. et al. Vascular proteomics, a translational approach: from traditional to novel proteomic techniques. **Expert Rev Proteomics**, v. 6, n. 5, p. 461-4, Oct 2009. ISSN 1744-8387.
- ¹⁰⁹ GÖRG, A. et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1037-53, Apr 2000. ISSN 0173-0835.
- ¹¹⁰ MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annu Rev Biochem**, v. 70, p. 437-73, 2001. ISSN 0066-4154.
- ¹¹¹ BJELLQVIST, B. et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. **J Biochem Biophys Methods**, v. 6, n. 4, p. 317-39, Sep 1982. ISSN 0165-022X.

- ¹¹² KONDO, T.; HIROHASHI, S. Application of highly sensitive fluorescent dyes (CyDye DIGE Fluor saturation dyes) to laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) for cancer proteomics. **Nat Protoc**, v. 1, n. 6, p. 2940-56, 2006. ISSN 1750-2799.
- ¹¹³ KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Anal Chem**, v. 60, n. 20, p. 2299-301, Oct 1988. ISSN 0003-2700.
- ¹¹⁴ FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, Oct 1989. ISSN 0036-8075.
- ¹¹⁵ ROEPSTORFF, P. Characterization of proteins by mass spectrometry. Invited lecture. **Analyst**, v. 117, n. 3, p. 299-303, Mar 1992. ISSN 0003-2654.
- ¹¹⁶ GILMAN, S. D.; CHAPMAN, P. J. Measuring electroosmotic flow in microchips and capillaries. **Methods Mol Biol**, v. 339, p. 187-202, 2006. ISSN 1064-3745.
- ¹¹⁷ MARTINEZ-PINNA, R. et al. Proteomics in atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep**, v. 10, n. 3, p. 209-15, Jun 2008. ISSN 1534-6242.
- ¹¹⁸ SINHA, I. et al. Differential regulation of the superoxide dismutase family in experimental aortic aneurysms and rat aortic explants. **J Surg Res**, v. 138, n. 2, p. 156-62, Apr 2007. ISSN 0022-4804.
- ¹¹⁹ GRANGER, J. et al. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. **Proteomics**, v. 5, n. 18, p. 4713-8, Dec 2005. ISSN 1615-9853.
- ¹²⁰ BURILLO, E. et al. ApoA-I/HDL-C levels are inversely associated with abdominal aortic aneurysm progression. **Thromb Haemost**, v. 113, n. 6, p. 1335-46, Jun 2015. ISSN 0340-6245.
- ¹²¹ LINDHOLT, J. S. et al. Screening for abdominal aortic aneurysms: single centre randomised controlled trial. **BMJ**, v. 330, n. 7494, p. 750, Apr 2005. ISSN 1756-1833.
- ¹²² MARTÍNEZ-BARTOLOMÉ, S. et al. Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method. **Mol Cell Proteomics**, v. 7, n. 6, p. 1135-45, Jun 2008. ISSN 1535-9484.

- ¹²³ NAVARRO, P.; VÁZQUEZ, J. A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases. **J Proteome Res**, v. 8, n. 4, p. 1792-6, Apr 2009. ISSN 1535-3893.
- ¹²⁴ JORGE, I. et al. Statistical model to analyze quantitative proteomics data obtained by 18O/16O labeling and linear ion trap mass spectrometry: application to the study of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in endothelial cells. **Mol Cell Proteomics**, v. 8, n. 5, p. 1130-49, May 2009. ISSN 1535-9484.
- ¹²⁵ BONZON-KULICHENKO, E. et al. A robust method for quantitative high-throughput analysis of proteomes by 18O labeling. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 1, p. M110.003335, Jan 2011. ISSN 1535-9484.
- ¹²⁶ KELLER, A. et al. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Anal Chem**, v. 74, n. 20, p. 5383-92, Oct 2002. ISSN 0003-2700.
- ¹²⁷ NESVIZHSHKII, A. I. et al. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Anal Chem**, v. 75, n. 17, p. 4646-58, Sep 2003. ISSN 0003-2700.
- ¹²⁸ LIU, H.; SADYGOV, R. G.; YATES, J. R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. **Anal Chem**, v. 76, n. 14, p. 4193-201, Jul 2004. ISSN 0003-2700.
- ¹²⁹ PHAM, T. V. et al. On the beta-binomial model for analysis of spectral count data in label-free tandem mass spectrometry-based proteomics. **Bioinformatics**, v. 26, n. 3, p. 363-9, Feb 2010. ISSN 1367-4811.
- ¹³⁰ CLOUGH, T. et al. Statistical design and analysis of label-free LC-MS proteomic experiments: a case study of coronary artery disease. **Methods Mol Biol**, v. 728, p. 293-319, 2011. ISSN 1940-6029.
- ¹³¹ AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Paraoxonases (PON1, PON2, PON3) analyses in vitro and in vivo in relation to cardiovascular diseases. **Methods Mol Biol**, v. 477, p. 259-76, 2008. ISSN 1064-3745.

- 132 NAVAB, M. et al. Intestine may be a major site of action for the apoA-I mimetic peptide 4F whether administered subcutaneously or orally. **J Lipid Res**, v. 52, n. 6, p. 1200-10, Jun 2011. ISSN 1539-7262.
- 133 DATTA, G. et al. Effects of increasing hydrophobicity on the physical-chemical and biological properties of a class A amphipathic helical peptide. **J Lipid Res**, v. 42, n. 7, p. 1096-104, Jul 2001. ISSN 0022-2275.
- 134 MARTIN-MCNULTY, B. et al. Noninvasive measurement of abdominal aortic aneurysms in intact mice by a high-frequency ultrasound imaging system. **Ultrasound Med Biol**, v. 31, n. 6, p. 745-9, Jun 2005. ISSN 0301-5629.
- 135 TARÍN, C. et al. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis or Fn14 deficiency reduce elastase perfusion-induced aortic abdominal aneurysm in mice. **J Am Heart Assoc**, v. 3, n. 4, Aug 2014. ISSN 2047-9980.
- 136 SUN, J. et al. Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. **J Clin Invest**, v. 117, n. 11, p. 3359-68, Nov 2007. ISSN 0021-9738.
- 137 NAVARRO, P. et al. General statistical framework for quantitative proteomics by stable isotope labeling. **J Proteome Res**, v. 13, n. 3, p. 1234-47, Mar 2014. ISSN 1535-3907.
- 138 JORGE, I. et al. The human HDL proteome displays high inter-individual variability and is altered dynamically in response to angioplasty-induced atheroma plaque rupture. **J Proteomics**, v. 106, p. 61-73, Jun 2014. ISSN 1876-7737.
- 139 PERNEMALM, M.; LEWENSOHN, R.; LEHTIÖ, J. Affinity prefractionation for MS-based plasma proteomics. **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1420-7, Mar 2009. ISSN 1615-9861.
- 140 AHARONI, S.; AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Paraoxonase 1 (PON1) reduces macrophage inflammatory responses. **Atherosclerosis**, v. 228, n. 2, p. 353-61, Jun 2013. ISSN 1879-1484.
- 141 POWELL, J. T. et al. Systematic review and meta-analysis of growth rates of small abdominal aortic aneurysms. **Br J Surg**, v. 98, n. 5, p. 609-18, May 2011. ISSN 1365-2168.

- ¹⁴² VEGA DE CÉNIGA, M. et al. Analysis of expansion patterns in 4-4.9 cm abdominal aortic aneurysms. **Ann Vasc Surg**, v. 22, n. 1, p. 37-44, Jan 2008. ISSN 0890-5096.
- ¹⁴³ NORMAN, P. et al. C-reactive protein levels and the expansion of screen-detected abdominal aortic aneurysms in men. **Circulation**, v. 110, n. 7, p. 862-6, Aug 2004. ISSN 1524-4539.
- ¹⁴⁴ HOVSEPIAN, D. M. et al. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with abdominal aortic aneurysms: a circulating marker of degenerative aneurysm disease. **J Vasc Interv Radiol**, v. 11, n. 10, p. 1345-52, 2000 Nov-Dec 2000. ISSN 1051-0443.
- ¹⁴⁵ HOUARD, X. et al. Differential inflammatory activity across human abdominal aortic aneurysms reveals neutrophil-derived leukotriene B4 as a major chemotactic factor released from the intraluminal thrombus. **FASEB J**, v. 23, n. 5, p. 1376-83, May 2009. ISSN 1530-6860.
- ¹⁴⁶ GIUSTI, B. et al. Genetic analysis of 56 polymorphisms in 17 genes involved in methionine metabolism in patients with abdominal aortic aneurysm. **J Med Genet**, v. 45, n. 11, p. 721-30, Nov 2008. ISSN 1468-6244.
- ¹⁴⁷ LINDHOLT, J. S. et al. Plasma levels of plasmin-antiplasmin-complexes are predictive for small abdominal aortic aneurysms expanding to operation-recommendable sizes. **J Vasc Surg**, v. 34, n. 4, p. 611-5, Oct 2001. ISSN 0741-5214.
- ¹⁴⁸ NORMAN, P. et al. Infraarenal aortic diameter predicts all-cause mortality. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 7, p. 1278-82, Jul 2004. ISSN 1524-4636.
- ¹⁴⁹ TAKAGI, H. et al. Plasma D-dimer and abdominal aortic aneurysm. **Thromb Res**, v. 126, n. 6, p. e451-2, Dec 2010. ISSN 1879-2472.
- ¹⁵⁰ VEGA DE CÉNIGA, M. et al. Search for serum biomarkers associated with abdominal aortic aneurysm growth--a pilot study. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 37, n. 3, p. 297-9, Mar 2009. ISSN 1532-2165.

- 151 VON ECKARDSTEIN, A.; KARDASSIS, D. High Density Lipoproteins. From Biological Understanding to Clinical Exploitation. : SpringerOpen. 224: 694 p. 2015.
- 152 FUKUDA, M. et al. Spontaneous reconstitution of discoidal HDL from sphingomyelin-containing model membranes by apolipoprotein A-I. **J Lipid Res**, v. 48, n. 4, p. 882-9, Apr 2007. ISSN 0022-2275.
- 153 VAISAR, T. et al. HDL in humans with cardiovascular disease exhibits a proteomic signature. **Clin Chim Acta**, v. 411, n. 13-14, p. 972-9, Jul 2010. ISSN 1873-3492.
- 154 RADER, D. J. Illuminating HDL--is it still a viable therapeutic target? **N Engl J Med**, v. 357, n. 21, p. 2180-3, Nov 2007. ISSN 1533-4406.
- 155 SMITH, J. D. Apolipoprotein A-I and its mimetics for the treatment of atherosclerosis. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 11, n. 9, p. 989-96, Sep 2010. ISSN 2040-3429.
- 156 SIGALA, F. et al. Relationship between iNOS expression and aortic cell proliferation and apoptosis in an elastase-induced model of aorta aneurysm and the effect of 1400 W administration. **Surgery**, v. 137, n. 4, p. 447-56, Apr 2005. ISSN 0039-6060.
- 157 SAWADA, H. et al. Aortic iron overload with oxidative stress and inflammation in human and murine abdominal aortic aneurysm. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 35, n. 6, p. 1507-14, Jun 2015. ISSN 1524-4636.
- 158 GRANÉR, M. et al. Association of paraoxonase-1 activity and concentration with angiographic severity and extent of coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol**, v. 47, n. 12, p. 2429-35, Jun 2006. ISSN 1558-3597.
- 159 SORAN, H. et al. How HDL protects LDL against atherogenic modification: paraoxonase 1 and other dramatis personae. **Curr Opin Lipidol**, v. 26, n. 4, p. 247-56, Aug 2015. ISSN 1473-6535.
- 160 PAGANO, M. B. et al. Complement-dependent neutrophil recruitment is critical for the development of elastase-induced abdominal aortic aneurysm. **Circulation**, v. 119, n. 13, p. 1805-13, Apr 2009. ISSN 1524-4539.

- ¹⁶¹ RAMELLA, N. A. et al. Human apolipoprotein A-I-derived amyloid: its association with atherosclerosis. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22532, 2011. ISSN 1932-6203.
- ¹⁶² MUCCHIANO, G. I. et al. Apolipoprotein A-I-derived amyloid in atherosclerotic plaques of the human aorta. **J Pathol**, v. 193, n. 2, p. 270-5, Feb 2001. ISSN 0022-3417.
- ¹⁶³ Apolipoprotein A-I-derived amyloid in atherosclerosis. Its association with plasma levels of apolipoprotein A-I and cholesterol. **Am J Clin Pathol**, v. 115, n. 2, p. 298-303, Feb 2001. ISSN 0002-9173.
- ¹⁶⁴ DIDONATO, J. A. et al. Function and distribution of apolipoprotein A1 in the artery wall are markedly distinct from those in plasma. **Circulation**, v. 128, n. 15, p. 1644-55, Oct 2013. ISSN 1524-4539.
- ¹⁶⁵ HERNÁNDEZ-AGUILERA, A. et al. Immunohistochemical analysis of paraoxonases and chemokines in arteries of patients with peripheral artery disease. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 5, p. 11323-38, 2015. ISSN 1422-0067.
- ¹⁶⁶ HUANG, Y. et al. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex. **J Clin Invest**, v. 123, n. 9, p. 3815-28, Sep 2013. ISSN 1558-8238.
- ¹⁶⁷ MOESTRUP, S. K.; NIELSEN, L. B. The role of the kidney in lipid metabolism. **Curr Opin Lipidol**, v. 16, n. 3, p. 301-6, Jun 2005. ISSN 0957-9672.
- ¹⁶⁸ MAÍGA, S. F.; KALOPISSIS, A. D.; CHABERT, M. Apolipoprotein A-II is a key regulatory factor of HDL metabolism as appears from studies with transgenic animals and clinical outcomes. **Biochimie**, v. 96, p. 56-66, Jan 2014. ISSN 1638-6183.
- ¹⁶⁹ LEE-RUECKERT, M.; KOVANEN, P. T. Extracellular modifications of HDL in vivo and the emerging concept of proteolytic inactivation of pre β -HDL. **Curr Opin Lipidol**, v. 22, n. 5, p. 394-402, Oct 2011. ISSN 1473-6535.
- ¹⁷⁰ SALMINEN, A. et al. Matrix metalloproteinase 8 degrades apolipoprotein A-I and reduces its cholesterol efflux capacity. **FASEB J**, v. 29, n. 4, p. 1435-45, Apr 2015. ISSN 1530-6860.

- 171 HAN, C. Y. et al. Serum amyloid A impairs the antiinflammatory properties of HDL. **J Clin Invest**, v. 126, n. 2, p. 796, Feb 2016. ISSN 1558-8238.
- 172 DINU, A. R. et al. Frequency of antibodies to the cholesterol transport protein apolipoprotein A1 in patients with SLE. **Lupus**, v. 7, n. 5, p. 355-60, 1998. ISSN 0961-2033.
- 173 DELGADO ALVES, J. et al. Antibodies to high-density lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 10, p. 2686-94, Oct 2002. ISSN 0004-3591.
- 174 VUILLEUMIER, N. et al. Presence of autoantibodies to apolipoprotein A-1 in patients with acute coronary syndrome further links autoimmunity to cardiovascular disease. **J Autoimmun**, v. 23, n. 4, p. 353-60, Dec 2004. ISSN 0896-8411.
- 175 MONTECUCCO, F. et al. Anti-Apolipoprotein A-1 auto-antibodies are active mediators of atherosclerotic plaque vulnerability. **Eur Heart J**, v. 32, n. 4, p. 412-21, Feb 2011. ISSN 1522-9645.
- 176 KELLER, P. F. et al. Autoantibodies against apolipoprotein A-1 and phosphorylcholine for diagnosis of non-ST-segment elevation myocardial infarction. **J Intern Med**, v. 271, n. 5, p. 451-62, May 2012. ISSN 1365-2796.
- 177 YUHANNA, I. S. et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. **Nat Med**, v. 7, n. 7, p. 853-7, Jul 2001. ISSN 1078-8956.
- 178 VUILLEUMIER, N. et al. Anti-(apolipoprotein A-1) IgGs are associated with high levels of oxidized low-density lipoprotein in acute coronary syndrome. **Clin Sci (Lond)**, v. 115, n. 1, p. 25-33, Jul 2008. ISSN 1470-8736.
- 179 HASSAN, M. A. et al. The Q192R polymorphism of the paraoxonase 1 gene is a risk factor for coronary artery disease in Saudi subjects. **Mol Cell Biochem**, v. 380, n. 1-2, p. 121-8, Aug 2013. ISSN 1573-4919.
- 180 GAMBOA, R. et al. [Low paraoxonase and arylesterase plasma activities in Mexican patients with coronary artery disease]. **Arch Cardiol Mex**, v. 78, n. 4, p. 360-8, 2008 Oct-Dec 2008. ISSN 1405-9940.

- 181 STRAUSS, E.; WALISZEWSKI, K.; PAWLAK, A. L. [The different genotypes of MTHFR 1298A>C and PON1 -108C>T polymorphisms confer the increased risk of the abdominal aortic aneurysm in the smoking and nonsmoking persons]. **Przegl Lek**, v. 62, n. 10, p. 1023-30, 2005. ISSN 0033-2240.
- 182 STRAUSS, E. et al. Increased risk of the abdominal aortic aneurysm in carriers of the MTHFR 677T allele. **J Appl Genet**, v. 44, n. 1, p. 85-93, 2003. ISSN 1234-1983.
- 183 JEENAH, M. et al. G to A substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI and high density lipoprotein cholesterol concentrations. **Mol Biol Med**, v. 7, n. 3, p. 233-41, Jun 1990. ISSN 0735-1313.
- 184 SAHA, N. et al. Guanidine to adenine (G/A) substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI levels in Chinese non-smokers. **Genet Epidemiol**, v. 11, n. 3, p. 255-64, 1994. ISSN 0741-0395.
- 185 GARNER, B. et al. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. **J Biol Chem**, v. 273, n. 11, p. 6088-95, Mar 1998. ISSN 0021-9258.
- 186 MURPHY, A. J. et al. High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 11, p. 2071-7, Nov 2008. ISSN 1524-4636.
- 187 NOFER, J. R. et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. **J Biol Chem**, v. 276, n. 37, p. 34480-5, Sep 2001. ISSN 0021-9258.
- 188 LOEFFLER, M.; KROEMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Exp Cell Res**, v. 256, n. 1, p. 19-26, Apr 2000. ISSN 0014-4827.
- 189 KRISHNA, S. M. et al. Fenofibrate increases high-density lipoprotein and sphingosine 1 phosphate concentrations limiting abdominal aortic aneurysm

- progression in a mouse model. **Am J Pathol**, v. 181, n. 2, p. 706-18, Aug 2012. ISSN 1525-2191.
- ¹⁹⁰ TORSNEY, E. et al. Elevation of plasma high-density lipoproteins inhibits development of experimental abdominal aortic aneurysms. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 11, p. 2678-86, Nov 2012. ISSN 1524-4636.
- ¹⁹¹ SETHI, A. A. et al. Apolipoprotein AI mimetic peptides: possible new agents for the treatment of atherosclerosis. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 8, n. 3, p. 201-12, Mar 2007. ISSN 1472-4472.
- ¹⁹² REMALEY, A. T. et al. Synthetic amphipathic helical peptides promote lipid efflux from cells by an ABCA1-dependent and an ABCA1-independent pathway. **J Lipid Res**, v. 44, n. 4, p. 828-36, Apr 2003. ISSN 0022-2275.
- ¹⁹³ ROSSONI, G. et al. Synthetic high-density lipoproteins exert cardioprotective effects in myocardial ischemia/reperfusion injury. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 308, n. 1, p. 79-84, Jan 2004. ISSN 0022-3565.
- ¹⁹⁴ GOMARASCHI, M. et al. Anti-inflammatory and cardioprotective activities of synthetic high-density lipoprotein containing apolipoprotein A-I mimetic peptides. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 324, n. 2, p. 776-83, Feb 2008. ISSN 1521-0103.
- ¹⁹⁵ NISSEN, S. E. et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 290, n. 17, p. 2292-300, Nov 2003. ISSN 1538-3598.
- ¹⁹⁶ MORGANTINI, C. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of HDLs are impaired in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2617-23, Oct 2011. ISSN 1939-327X.
- ¹⁹⁷ ANANTHARAMAIAH, G. M. et al. Studies of synthetic peptide analogs of the amphipathic helix. Structure of complexes with dimyristoyl phosphatidylcholine. **J Biol Chem**, v. 260, n. 18, p. 10248-55, Aug 1985. ISSN 0021-9258.
- ¹⁹⁸ ANANTHARAMAIAH, G. M. Synthetic peptide analogs of apolipoproteins. **Methods Enzymol**, v. 128, p. 627-47, 1986. ISSN 0076-6879.

- 199 YANCEY, P. G. et al. Efflux of cellular cholesterol and phospholipid to lipid-free apolipoproteins and class A amphipathic peptides. **Biochemistry**, v. 34, n. 24, p. 7955-65, Jun 1995. ISSN 0006-2960.
- 200 DATTA, G. et al. Aromatic residue position on the nonpolar face of class a amphipathic helical peptides determines biological activity. **J Biol Chem**, v. 279, n. 25, p. 26509-17, Jun 2004. ISSN 0021-9258.
- 201 NAVAB, M. et al. Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice. **Circulation**, v. 109, n. 25, p. 3215-20, Jun 2004. ISSN 1524-4539.
- 202 OSEI-HWEDIEH, D. O. et al. Apolipoprotein mimetic peptides: Mechanisms of action as anti-atherogenic agents. **Pharmacol Ther**, v. 130, n. 1, p. 83-91, Apr 2011. ISSN 1879-016X.
- 203 BLOEDON, L. T. et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients. **J Lipid Res**, v. 49, n. 6, p. 1344-52, Jun 2008. ISSN 0022-2275.
- 204 SORAN, H.; SCHOFIELD, J. D.; DURRINGTON, P. N. Antioxidant properties of HDL. **Front Pharmacol**, v. 6, p. 222, 2015. ISSN 1663-9812.
- 205 SORAN, H. et al. Variation in paraoxonase-1 activity and atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol**, v. 20, n. 4, p. 265-74, Aug 2009. ISSN 1473-6535.
- 206 TWARD, A. et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. **Circulation**, v. 106, n. 4, p. 484-90, Jul 2002. ISSN 1524-4539.
- 207 GUZIK, B. et al. Mechanisms of oxidative stress in human aortic aneurysms--association with clinical risk factors for atherosclerosis and disease severity. **Int J Cardiol**, v. 168, n. 3, p. 2389-96, Oct 2013. ISSN 1874-1754.
- 208 ROSENBLAT, M. et al. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. **J Biol Chem**, v. 281, n. 11, p. 7657-65, Mar 2006. ISSN 0021-9258.

- ²⁰⁹ BESLER, C. et al. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. **J Clin Invest**, v. 121, n. 7, p. 2693-708, Jul 2011. ISSN 1558-8238.
- ²¹⁰ GAVRILA, D. et al. Vitamin E inhibits abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 8, p. 1671-7, Aug 2005. ISSN 1524-4636.
- ²¹¹ XIONG, W. et al. Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm formation in a murine model. **Atherosclerosis**, v. 202, n. 1, p. 128-34, Jan 2009. ISSN 1879-1484.
- ²¹² GRIGORYANTS, V. et al. Tamoxifen up-regulates catalase production, inhibits vessel wall neutrophil infiltration, and attenuates development of experimental abdominal aortic aneurysms. **J Vasc Surg**, v. 41, n. 1, p. 108-14, Jan 2005. ISSN 0741-5214.
- ²¹³ MAIELLARO-RAFFERTY, K. et al. Catalase overexpression in aortic smooth muscle prevents pathological mechanical changes underlying abdominal aortic aneurysm formation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 2, p. H355-62, Aug 2011. ISSN 1522-1539.
- ²¹⁴ MACKNESS, B. et al. Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 318, n. 3, p. 680-3, Jun 2004. ISSN 0006-291X.
- ²¹⁵ ROSENBLAT, M. et al. Paraoxonase 1 (PON1) inhibits monocyte-to-macrophage differentiation. **Atherosclerosis**, v. 219, n. 1, p. 49-56, Nov 2011. ISSN 1879-1484.
- ²¹⁶ MARTIN-VENTURA, J. L. et al. Erythrocytes, leukocytes and platelets as a source of oxidative stress in chronic vascular diseases: detoxifying mechanisms and potential therapeutic options. **Thromb Haemost**, v. 108, n. 3, p. 435-42, Sep 2012. ISSN 0340-6245.
- ²¹⁷ AHMED, Z. et al. Paraoxonase-1 reduces monocyte chemotaxis and adhesion to endothelial cells due to oxidation of palmitoyl, linoleoyl glycerophosphorylcholine. **Cardiovasc Res**, v. 57, n. 1, p. 225-31, Jan 2003. ISSN 0008-6363.

- 218 RIWANTO, M. et al. Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling. **Circulation**, v. 127, n. 8, p. 891-904, Feb 2013. ISSN 1524-4539.
- 219 GARCÍA-HEREDIA, A. et al. Paraoxonase-1 inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced metabolic alterations and apoptosis in endothelial cells: a nondirected metabolomic study. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 156053, 2013. ISSN 1466-1861.
- 220 KOLATTUKUDY, P. E.; NIU, J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway. **Circ Res**, v. 110, n. 1, p. 174-89, Jan 2012. ISSN 1524-4571.
- 221 LAUSTSEN, J. et al. Accuracy of clinical data in a population based vascular registry. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 27, n. 2, p. 216-9, Feb 2004. ISSN 1078-5884.
- 222 LINDHOLT, J. S. et al. The validity of ultrasonographic scanning as screening method for abdominal aortic aneurysm. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 17, n. 6, p. 472-5, Jun 1999. ISSN 1078-5884.
- 223 IBANEZ, B.; VILAHUR, G.; BADIMON, J. J. Plaque progression and regression in atherothrombosis. **J Thromb Haemost**, v. 5 Suppl 1, p. 292-9, Jul 2007. ISSN 1538-7933.
- 224 CHOI, B. G. et al. The role of high-density lipoprotein cholesterol in the prevention and possible treatment of cardiovascular diseases. **Curr Mol Med**, v. 6, n. 5, p. 571-87, Aug 2006. ISSN 1566-5240.
- 225 BARTER, P. et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. **N Engl J Med**, v. 357, n. 13, p. 1301-10, Sep 2007. ISSN 1533-4406.
- 226 KANNEL, W. B. High-density lipoproteins: epidemiologic profile and risks of coronary artery disease. **Am J Cardiol**, v. 52, n. 4, p. 9B-12B, Aug 1983. ISSN 0002-9149.

- 227 GENEST, J. J. et al. Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. **Am J Cardiol**, v. 67, n. 15, p. 1185-9, Jun 1991. ISSN 0002-9149.
- 228 TURAY, J.; GRNIAKOVÁ, V.; VALKA, J. Changes in paraoxonase and apolipoprotein A-I, B, C-III and E in subjects with combined familial hyperlipoproteinemia treated with ciprofibrate. **Drugs Exp Clin Res**, v. 26, n. 3, p. 83-8, 2000. ISSN 0378-6501.
- 229 BALOGH, Z. et al. Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates? **Diabetes Metab**, v. 27, n. 5 Pt 1, p. 604-10, Nov 2001. ISSN 1262-3636.
- 230 RUBINS, H. B. et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. **N Engl J Med**, v. 341, n. 6, p. 410-8, Aug 1999. ISSN 0028-4793.
- 231 KEECH, A. et al. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. **Lancet**, v. 366, n. 9500, p. 1849-61, Nov 2005. ISSN 1474-547X.
- 232 TAYLOR, A. J. et al. Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol (ARBITER) 2: a double-blind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins. **Circulation**, v. 110, n. 23, p. 3512-7, Dec 2004. ISSN 1524-4539.
- 233 LEE, J. M. et al. Effects of high-dose modified-release nicotinic acid on atherosclerosis and vascular function: a randomized, placebo-controlled, magnetic resonance imaging study. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 19, p. 1787-94, Nov 2009. ISSN 1558-3597.
- 234 PAOLINI, J. F. et al. Effects of laropiprant on nicotinic acid-induced flushing in patients with dyslipidemia. **Am J Cardiol**, v. 101, n. 5, p. 625-30, Mar 2008. ISSN 0002-9149.

- 235 DE GROOTH, G. J. et al. Efficacy and safety of a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, JTT-705, in humans: a randomized phase II dose-response study. **Circulation**, v. 105, n. 18, p. 2159-65, May 2002. ISSN 1524-4539.
- 236 CLARK, R. W. et al. Raising high-density lipoprotein in humans through inhibition of cholesteryl ester transfer protein: an initial multidose study of torcetrapib. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 3, p. 490-7, Mar 2004. ISSN 1524-4636.
- 237 BROUSSEAU, M. E. et al. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. **N Engl J Med**, v. 350, n. 15, p. 1505-15, Apr 2004. ISSN 1533-4406.
- 238 VERGEER, M. et al. Cholesteryl ester transfer protein inhibitor torcetrapib and off-target toxicity: a pooled analysis of the rating atherosclerotic disease change by imaging with a new CETP inhibitor (RADIANCE) trials. **Circulation**, v. 118, n. 24, p. 2515-22, Dec 2008. ISSN 1524-4539.
- 239 FRANCESCHINI, G. et al. A-IMilano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. **J Clin Invest**, v. 66, n. 5, p. 892-900, Nov 1980. ISSN 0021-9738.
- 240 SIRTORI, C. R. et al. Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant: the Limone sul Garda study. **Circulation**, v. 103, n. 15, p. 1949-54, Apr 2001. ISSN 1524-4539.
- 241 DELBOSC, S. et al. High-density lipoprotein therapy inhibits *Porphyromonas gingivalis*-induced abdominal aortic aneurysm progression. **Thromb Haemost**, v. 115, n. 4, p. 789-99, Apr 2016. ISSN 0340-6245.
- 242 ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; AVIRAM, M. Injection of paraoxonase 1 (PON1) to mice stimulates their HDL and macrophage antiatherogenicity. **Biofactors**, v. 37, n. 6, p. 462-7, 2011 Nov-Dec 2011. ISSN 1872-8081.
- 243 AVIRAM, M. et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions:

- PON1 esterase and peroxidase-like activities. **Circulation**, v. 101, n. 21, p. 2510-7, May 2000. ISSN 1524-4539.
- ²⁴⁴ ROZENBERG, O. et al. Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n. 6, p. 774-84, Mar 2003. ISSN 0891-5849.